



**UNIVERSITÀ DI PISA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea Magistrale in  
Biologia Applicata alla Biomedicina**

**Tesi di Laurea**

**Modulazione dell'espressione genica e della  
capacità antiossidante in ratti maschi adulti  
sottoposti ad esercizio fisico prolungato**

Candidato:  
**Vitalba Agosta**

Relatore:  
**Dott.ssa Rossana Scuri**

Anno Accademico 2014-15

*Alla mia Famiglia.*

## RIASSUNTO

L'ipotesi che l'esercizio fisico rappresenti un fattore di protezione per l'intero organismo oggi non è più un'ipotesi. Le evidenze scientifiche hanno ormai chiarito che l'attività fisica moderata e costante nel tempo induce benefici energetici, biochimici e fisiologici, migliorando la qualità della vita e il benessere globale della persona. Questi effetti benefici hanno una valenza maggiore se a sottoporsi ad attività fisica è un anziano. Inoltre, sembra che l'attività fisica, praticata da soggetti adulti, combatta gli effetti dell'invecchiamento e ne ritardi i sintomi, limitando i danni legati allo stress ossidativo per aumento delle capacità antiossidanti delle cellule "adulte".

Il legame meccanicistico tra esercizio fisico e invecchiamento è stato sconosciuto fino agli anni 50. Nel 1957 Harman ipotizzò che la causa della senescenza cellulare fosse un lento spegnimento dell'attività mitocondriale, che, con il procedere degli anni, determina un accumulo di radicali liberi e una ridotta capacità antiossidante, portando la cellula ad apoptosi. Sulla base di questa teoria, successivi studi su modelli animali adulti, sottoposti ad esercizio fisico, hanno valutato una correlazione tra l'attività fisica e l'allungamento della durata della vita, grazie ad una riduzione dello stress ossidativo. Ciò sembra dovuto all'attività deacetilasi di specifiche proteine  $\text{NAD}^+$ -dipendenti quali le sirtuine. Il significativo interesse rivolto al ruolo delle sirtuine come proteine antinvecchiamento ha portato i ricercatori a valutare inizialmente i meccanismi biochimico-molecolari che vedono coinvolte queste importanti deacetilasi. È stato così chiarito come l'esercizio fisico attivi le sirtuine, aumentando i livelli di molecole di  $\text{NAD}^+$ -disponibili; una volta attivate, le sirtuine, mediante la deacetilazione di specifiche molecole bersaglio, oltre che gestire importanti processi metabolici cellulari, aumentano l'attività dei sistemi *scavenger* della cellula (SOD2, catalasi, glutathione perossidasi, MnSOD) e favoriscono la biogenesi mitocondriale PGC1 $\alpha$ -mediata. L'invecchiamento cellulare, di contro, incide negativamente sull'attività delle sirtuine, per sottrazione delle molecole di  $\text{NAD}^+$  a favore dell'attività di riparazione dei danni al DNA PARP-mediati. Dunque l'esercizio fisico e i processi di senescenza cellulare regolano l'attività delle sirtuine a valle; ciò che è ancora poco chiaro è se modulino l'espressione genica di queste proteine. Scopo della presente tesi è stato quello di capire se la maggiore attivazione delle sirtuine, a seguito di attività fisica dipenda da un

incremento della loro espressione genica e/o proteica, o da un aumento della loro attività deacetilasica per incremento di NAD<sup>+</sup>. È stata dunque valutata l'espressione genica della sirtuina 1 e della sirtuina 3 in vari tessuti ottenuti da ratti maschi adulti sottoposti ad esercizio fisico prolungato e costante, e da ratti maschi adulti sedentari; inoltre è stata avviata la misurazione della capacità antiossidante nei tessuti dei ratti allenati per valutare eventuali differenze rispetto ai sedentari.

Sono stati utilizzati 8 ratti maschi del ceppo Wistar di 3/5 mesi, casualmente divisi in due gruppi: 5 allenati e 3 sedentari. È stato ideato un protocollo di allenamento, della durata complessiva di 6 settimane, che consisteva di 3 sedute a settimana in cui l'animale, singolarmente, veniva costretto a seguire camminando il movimento rotatorio di una ruota motorizzata. Ciascuna sessione di allenamento prevedeva 30 minuti di movimento e la velocità di rotazione della ruota subiva un incremento di 1m/min, ogni 15 minuti, sessione dopo sessione, in modo che i ratti progressivamente percorrevano distanze maggiori. I sedentari, invece, venivano portati nella stanza di allenamento insieme ai ratti allenati ma venivano lasciati nella loro gabbia di stabulazione per tutta la durata dell'allenamento. Una settimana dopo il termine dell'allenamento i ratti sono stati sacrificati e da essi sono stati ottenuti campioni di tessuto cardiaco, tessuto muscolare (muscolo gastrocnemio), tessuto epatico, e porzioni di tessuto cerebrale comprendenti principalmente l'ippocampo. La metà dei campioni ottenuti è stata immediatamente omogenizzata, frazionata e stoccata a -80°C per essere successivamente utilizzata nell'analisi TOSCA (*Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay*). L'altra metà dei campioni è stata conservata a -80°C e utilizzata per l'analisi trascrizionale: estratto l'RNA, è stata effettuata una qRT-PCR *real time* su tutti i campioni, per valutare i cambiamenti d'espressione dei geni sirt1, sirt3 e del gene che codifica per NGF (valutato solo nell'ippocampo). Mediante il metodo del  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , i livelli di espressione di ciascun gene *target* sono stati normalizzati rispetto ai geni *house-keeping* (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi e  $\beta$ -actina) e l'incremento o il decremento di espressione è stato determinato in rapporto al controllo rappresentato dai campioni prelevati dai ratti sedentari. I risultati ottenuti mediante l'analisi trascrizionale mostrano come l'attività fisica a cui sono stati sottoposti i 5 ratti sperimentali abbia determinato un aumento significativo dell'espressione genica di sirt1 a livello cardiaco, e del gene per la

neurotrofina NGF a livello ippocampale. Negli altri tessuti non è stata osservata alcuna variazione significativa dei livelli di espressione nei ratti allenati rispetto ai sedentari.

I risultati ottenuti dall'analisi TOSCA, al momento condotta solo sui campioni di ippocampo, hanno mostrato un aumento di attività antiossidante specifica sia nei confronti dei radicali perossilici, idrossilici e dei derivati del perossinitrito nei ratti allenati, rispetto a quella osservata nei sedentari.

Di particolare interesse è l'incremento dell'attività antiossidante nei confronti dei radicali idrossilici, osservato nei ratti allenati, data la loro caratteristica eccessiva tossicità e reattività. L'organismo li contrasta solo parzialmente e dall'esperienza clinica sembra che gli antiossidanti disponibili in commercio abbiano scarsa efficacia nei confronti di questa specie radicalica; pertanto assume particolare importanza il fatto che un'attività fisica moderata e costante sviluppi una buona attività antiossidante proprio nei confronti dei radicali idrossilici.

## ABSTRACT

The hypothesis that physical exercise represents a protection factor for the entire body is no longer a hypothesis. Scientific evidence has now clearly established that moderate and constant physical activity over time induces biochemical, physiological and energetical benefits, improving the quality of the life and the wellness of the human. These beneficial effects have a high value if a senior undergoes physical activity. Moreover, the physical activity, practiced by adults, seems to combat the effects of aging by delaying the symptoms and limiting the damage related to oxidative stress through an increase of the antioxidant capacity in "adult cells." The mechanistic link between exercise and aging was unknown until 1950. In 1957, Harman suggested that the cause of the cell senescence was a slow reduction of the mitochondrial activity over time, which causes an accumulation of free radicals and a reduced antioxidant capacity leading to apoptosis. Based on this theory, subsequent studies carried out in adult animals subjected to physical exercise showed a correlation between the physical activity and the increase in the length of the life by a reduction of oxidative stress due to the deacetylase activity of specific NADH-dependent proteins, such as sirtuins (SIRTs). The role of SIRTs as anti-aging proteins has been initially evaluated with studies about the biochemical and molecular mechanisms underlying their deacetylase activity. It has been clarified that the physical exercise increases the levels of molecules of  $\text{NAD}^+$  - available and so activates SIRTs. SIRTs, through deacetylation of specific target molecules, increase the activity of the scavenger cell systems (SOD2, catalase, glutathione peroxidase, MnSOD) and promote PGC1 $\alpha$ - mediated mitochondrial biogenesis as well as regulate important cellular metabolic processes. On the contrary, the aging processes reduce the activity of SIRTs because  $\text{NAD}^+$  molecules are used to activate PARP for repairing the DNA damage. Therefore, both the physical exercise and the cellular senescence processes affect the activity of SIRTs. It is still unclear if the physical exercise or aging affect the modulation of gene expression of these proteins. The aim of this thesis was to understand whether the increased activation of SIRTs, as a result of physical activity, depends on an increase in their gene expression.

We assessed the gene expression of the sirtuin 1 and sirtuin 3 in various tissues obtained from adult male rats subjected to prolonged and constant exercise, and sedentary adult male rats. Eight Wistar male rats (3/5 months old) were randomly

divided into two groups: 3 sedentary and 5 trained. The trained rats followed a properly designed training protocol, which consisted of three training sessions a week for six weeks; in each session, 30 minutes duration, performed in a proper training room, the animal, individually, was forced to walk following the rotary movement of a motorized wheel. In every session, the rotation speed of the wheel underwent an increase of 1m / min, every 15 minutes, so that the rats gradually traveling along greater distances. The sedentary rats, were brought into the training room with the trained rats but were left in their "home cage" for the entire duration of the training session. A week after the end of the training, the rats were sacrificed and samples of heart tissue, muscle tissue (gastrocnemius muscle), liver tissue and brain tissue including the hippocampus were obtained. Half of these samples was immediately homogenized, fractionated and stored at -80°C to be subsequently used in the TOSCA (Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay) analysis to evaluate the antioxidant capacity of the tissues belonging to trained and sedentary rats.

The other half of the samples was stored at -80°C and used for the transcriptional analysis by qRT-PCR Real Time. We evaluated the gene expression of sirt1, sirt3 and, only in the hippocampus, of the gene coding for NGF. Through the method of  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , the expression levels of each target gene were normalized to house-keeping genes (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and  $\beta$ -actin) and an increase or a decrease of expression was determined respect to the control represented by the samples taken from the sedentary rats. The results obtained showed that the physical activity significantly increased the gene expression of sirt1 in cardiac tissue, and the gene coding for NGF in hippocampus. In other tissues, no different gene expression was detected in trained compared to sedentary rats.

The TOSCA analysis, carried out on samples of hippocampus, showed an increase of antioxidant activity, specific for the three different radical species analyzed, peroxy, hydroxyl and peroxynitrite –derived radicals, in trained rats compared to the sedentary ones. Of particular interest is the increase of the antioxidant activity towards the hydroxyl radicals, observed in rats trained, given their characteristic toxicity and reactivity. The body contrasts the hydroxyl radical only partially and the available antioxidants have limited effectiveness against this radical species;

therefore, the fact that moderate and regular exercise develops a good antioxidant activity own against hydroxyl radicals has particular importance.



# INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 L'INVECCHIAMENTO LEGATO ALLO STRESS OSSIDATIVO.....	4
1.2 LE SIRTUINE.....	6
1.2.1 SIRTUINA 1 .....	12
1.2.2 SIRTUINA 3 .....	16
1.3 SIRTUINE E ROS.....	19
1.4 NEUROTROFINE ED ESERCIZIO FISICO.....	22
2. SCOPO DELLA TESI .....	23
3. MATERIALI E METODI.....	25
3.1 ANIMALI.....	25
3.2 ALLENAMENTO.....	26
3.3 ISOLAMENTO E CONSERVAZIONE DEI TESSUTI.....	30
3.4 ANALISI TOSCA ( <i>Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay</i> ).....	30
3.5 ANALISI TRASCRIZIONALE .....	33
3.5.1 ESTRAZIONE RNA.....	33
3.5.2 q RT- PCR <i>Real Time</i> .....	35
3.6 ANALISI STATISTICA.....	37
4. RISULTATI .....	38
4.1 ALLENAMENTO.....	38
4.2 ESPRESSIONE GENICA DI sirt1 E sirt3 NEI DIVERSI TESSUTI.....	40
4.3 ESPRESSIONE GENICA DI sirt1, sirt3 E DEL GENE CODIFICANTE PER NGF NELL'IPPOCAMPO.....	43
4.4 ANALISI TOSCA.....	44

5. DISCUSSIONE.....	45
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE .....	50
7. BIBLIOGRAFIA.....	51

# 1. INTRODUZIONE

L'associazione tra attività fisica e salute era riconosciuta già a partire dal V sec. A.C. da Ippocrate: “ Tutte le parti del corpo che hanno una funzione, se usate con moderazione ed esercitate nell'attività alla quale sono deputate, diventano più sane, ben sviluppate ed invecchieranno più lentamente; ma se non saranno usate e lasciate inattive, queste diventeranno facili ad ammalarsi, difettose nella crescita ed invecchieranno precocemente.” Ippocrate, Salute.

In epoca moderna, si è raggiunta la consapevolezza scientifica che l'esercizio fisico, se praticato in modo regolare, strutturato e ripetitivo, non solo favorisce la migliore funzionalità degli apparati del nostro corpo, ma incide in modo significativo sulla qualità della vita, sullo stato di salute e sul benessere globale della persona, anche nella sua dimensione psicologica. Al contrario, la sedentarietà è considerata, a tutti gli effetti e in relazione ai risultati di studi e ricerche pubblicate a livello internazionale, come un rilevante fattore di rischio per l'insorgenza di patologie importanti e per la conseguente incidenza sui livelli di mortalità della popolazione.

Sempre più sono i lavori scientifici (vedi ad esempio: McArdle et al. 2009; Paoli et al., 2013) che dimostrano come l'esercizio fisico praticato in età adulta, oltre a migliorare la qualità della vita, contribuisca a combattere gli effetti dell'invecchiamento, ritardandone i sintomi, aiutando la persona a restare in contatto con l'ambiente sociale e preservandola così dall'isolamento. Rispetto ai soggetti anziani sedentari, i soggetti anziani allenati mostrano:

- minor accumulo di grasso totale e addominale (Conti, cap. 71, 2010);
- maggior volume di massa muscolare relativa negli arti (Conti, cap. 73, 2010);
- maggiore densità minerale ossea nei punti sollecitati del carico (Conti, cap. 73, 2010);
- muscolatura articolare più resistente ai processi ossidativi e all'affaticamento (Conti, cap. 73, 2010);
- maggiore capacità di trasportare e utilizzare ossigeno (Conti, cap. 72, 2010);
- maggiore gittata cardiaca durante il massimo sforzo e un modello di riempimento del ventricolo sinistro “più giovane” (Conti, cap. 72, 2010);

- minore stress cardiovascolare e metabolico durante l'esercizio svolto a qualsiasi intensità di sforzo sub massimale (Conti, cap. 72, 2010);
- profilo di rischio coronarico significativamente ridotto: ridotta pressione sanguigna, aumentata variabilità della frequenza cardiaca (Conti, cap. 72, 2010);
- migliore reattività endoteliale: *shear stress* endoteliale per incremento di eNOS (NO sintetasi endoteliale) (Franzoni et al., 2004; Chang & Guarente, 2014);
- arteriogenesi e angiogenesi capillare, per aumento dell'espressione genica di VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare) (Benoit et al., 1999);
- migliore omeostasi del glucosio (Conti, cap. 71, 2010);
- gli indici di flogosi sistemica ridotti (Conti, cap. 71, 2010);
- migliore capacità fibrinolitica, coagulazione e adesività piastrinica (Conti, cap. 71, 2010);
- migliore capacità lipolitica (Conti, cap. 71, 2010);
- ridotti livelli di trigliceridi, LDL, colesterolo totale (Conti, cap. 71, 2010);
- aumentati livelli di HDL (Conti, cap. 71, 2010);
- maggiore velocità di conduzione nervosa (Conti, cap. 12, 2010);
- rallentamento dello sviluppo di disabilità in vecchiaia (Conti, cap. 76, 2010);
- ridotto rischio di mortalità (Conti, cap. 76, 2010).

Tutti questi dati supportano le linee guida sottoscritte dall'American College of Sports Medicine, raccomandate a tutta la popolazione, con particolare attenzione ai soggetti anziani: la pratica dell'esercizio fisico aerobico, di intensità moderata (possibilmente 3 volte a settimana), è considerato uno strumento necessario e sufficiente a produrre i benefici attesi (American College of Sports Medicine, 2009).

È però necessario tenere sempre ben presente quanto affermato da Merati (2002):

“Anche l'esercizio fisico, come ogni altro farmaco, possiede una propria *finestra terapeutica*, cioè un'area di *dosaggio* al di sotto della quale i benefici terapeutici sono minimi o nulli, e al di sopra della quale, il *sovradosaggio* di esercizio può causare problemi all'organismo. Volendo dunque giungere ad una prescrizione

*posologica* dell'esercizio fisico, come fattore protettivo contro il rischio di patologie, si rende necessaria una migliore comprensione dei meccanismi che sottendono i benefici dell'attività fisica”.

Nonostante siano elencabili, gli effetti positivi di una moderata attività fisica sono ancora poco compresi per quanto riguarda i meccanismi molecolari e cellulari che ne sono alla base; le complesse reazioni cellulari coinvolte, e le possibili variabili confondenti che si inseriscono negli studi effettuati sull'uomo (stile di vita, caratteristiche individuali e abitudini secondarie), rendono difficoltosi i lavori diretti a focalizzare i meccanismi indotti dall'esercizio fisico nell'uomo. Perciò si ricorre alla sperimentazione su modelli animali, dove il carico genetico comune e l'assenza di variabili confondenti permettono di esaminare i meccanismi direttamente a livello molecolare e metabolico. Molto più spesso i ricercatori sottopongono modelli animali (ad esempio ratti) ad un *training* volontario o “forzato” (*treadmill running*, *voluntary wheel running* o *swimming exercise*), i cui effetti sembrano essere comparabili agli effetti dell'esercizio fisico di egual intensità e durata negli uomini.

Nel presente lavoro di tesi, un gruppo di ratti ha eseguito un programma di allenamento moderato “forzato” al termine del quale da essi sono stati prelevati campioni di tessuto per eseguire analisi biologico-molecolari e saggi sull'attività antiossidante.

## **1.1 L'INVECCHIAMENTO LEGATO ALLO STRESS OSSIDATIVO**

L'invecchiamento comprende quel complesso di modificazioni morfologiche e funzionali, di tipo involutivo, intrinseche all'organismo, che intervengono nell'individuo adulto per la sola azione del fattore tempo. Le cause possono essere riconducibili sia a fattori ereditari e congeniti (invecchiamento primario), che ad elementi esogeni (biologici, sociali, economici) che accelerano il processo di senescenza naturale (invecchiamento secondario).

Da un punto di vista fisiologico, l'individuo anziano va incontro ad una serie di alterazioni strutturali-funzionali dei vari organi, che progrediscono verso la manifestazione di diverse patologie, molto comuni nell'anziano, sia cardiovascolari (obesità viscerale, dislipidemia, ipertensione arteriosa), che croniche (osteoporosi, diabete, neoplasie, depressione, deterioramento cognitivo) (Berlin & Colditz, 1990).

Nel tempo sono state elaborate varie teorie per spiegare il processo di senescenza. Le teorie maggiormente riconosciute sono: la teoria del danneggiamento progressivo, riconducibile alla reattività dei radicali liberi elaborata come teoria nel 1957 in seguito a studi condotti da Harman (1956) e la teoria dell'accorciamento dei telomeri o della senescenza replicativa (Hayflick 1961), secondo la quale la durata della vita è determinata a livello genico: i telomeri vengono considerati degli orologi biologici che determinano il numero delle divisioni a cui una cellula somatica va incontro nel corso della sua vita, ed è proprio l'accorciamento dei telomeri che limita il potenziale proliferativo delle cellule (Alberts et al., cap.17, 22, 2009).

La reattività dei radicali liberi non è ereditaria, ma è il risultato di un danno cumulativo correlato con il tempo. Il metabolismo aerobico produce, normalmente, specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali superossido, perossido di idrogeno, radicale idrossile, in diverse sedi cellulari (membrana plasmatica, mitocondri, reticolo endoplasmatico liscio, perossisomi e citosol). A concentrazioni moderate, sottoforma di risposta adattativa (ormesi mitocondriale)<sup>1</sup>, i ROS partecipano attivamente ad una varietà di processi biologici complessi, implicati nella normale crescita cellulare, nella

---

<sup>1</sup> Ormesi mitocondriale: dosi relativamente basse di fattori di stress (ROS), agiscono nel suscitare una risposta adattativa allo stress (stato stazionario); dosi elevate risultano deleterie. Radicali liberi a concentrazioni moderate inducono un aumento della difesa allo stress, fino al raggiungimento di un nuovo stato ormetico stazionario (Figura 1.7) (Merksamer et al., 2013).

proliferazione, nel differenziamento, nella trasduzione del segnale, nel controllo dell'espressione genica, nell'apoptosi e nella difesa antimicrobica. Il mantenimento dello stato omeostatico dei livelli di ROS è dovuto all'attività di sistemi che operano limitando la loro produzione (sistemi *scavenger*), di origine endogena o esogena, enzimatici e non quali ad esempio la superossido dismutasi, la catalasi e la glutathione perossidasi, il glutathione, la vitamina A e la vitamina E, che sono in grado di contrastare l'attività ossidante dei radicali liberi, limitandone l'accumulo. Quando la produzione di radicali liberi aumenta e/o quando diminuiscono i sistemi antiossidanti per fattori endogeni e/o esogeni (dieta, stile di vita, abuso di tabacco e alcol, radiazioni etc.), si crea la condizione di stress ossidativo, che conduce all'atrofia dei tessuti attraverso necrosi o apoptosi e, quindi, a senescenza.

Una delle più note conseguenze negative dell'accumulo dei radicali liberi, è rappresentata dall'alterazione della fluidità e della selettività della membrana cellulare (perossidazione lipidica). Con il procedere dell'età, la membrana perde progressivamente la sua normale efficienza e porta ad un accumulo di sostanze tossiche con conseguente perdita di funzione e progressione senile dei tessuti. L'insolubilità lipidica che caratterizza la maggior parte delle specie radicaliche limita la loro capacità di diffusione; pertanto anche i mitocondri, potentissimi generatori di specie radicaliche, diventano sede primaria dei danni provocati dallo stress ossidativo. Come conseguenza di questa situazione, i mitocondri si alterano facilmente e, anche se possono essere sostituiti, con l'età essi diventano meno efficienti, meno numerosi e più grandi. Aumenta così la produzione di ROS, l'attività di molti sistemi *scavenger* endogeni diminuisce, si accumulano negli anni mutazioni al DNA mitocondriale (mtDNA) e si innesca un circolo vizioso che porta ad ulteriore produzione di ROS, con conseguente accumulo di danno ossidativo. Il tutto si riflette sia sulla diminuzione della produzione di ATP e quindi della capacità di assicurare un supporto energetico adeguato alle necessità dell'organismo, sia sull'alterazione di tutti quei complessi processi che avvengono nel e per attività del mitocondrio, come ad esempio il meccanismo di apoptosi: l'incremento dei livelli di ROS può indurre l'apertura dei pori di permeabilità mitocondriali, favorendo il rilascio di fattori pro-apoptotici (Finkel & Holbrook, 2000; Ben-Porath & Weinberg, 2005).

Negli ultimi anni, l'ipotesi che ROS generati dai mitocondri giochino un ruolo nell'invecchiamento organico è stata direttamente testata sia in sistemi di modelli di invertebrati sia di mammiferi, attraverso interventi farmacologici o modelli transgenici, valutando gli effetti dell'inibizione o dell'eccessiva attività di specifiche molecole antiossidanti (Golden et al., 2002).

Altri cambiamenti legati all'età, come un decremento dei livelli ormonali o un'aumentata resistenza periferica all'insulina, possono incentivare il declino dell'attività mitocondriale. In uno studio (Shigenaga et al., 1994), condotto su ratti si è potuto constatare come l'attività fisica e la restrizione calorica, attivando meccanismi di risposta simili a quelli indotti da condizioni di stress ossidativo, possano ridurre il danno ossidativo, attraverso un aumento delle capacità enzimatiche antiossidanti dell'individuo e migliorarne la funzione mitocondriale. L'attività deacetilasica di specifiche proteine  $\text{NAD}^+$  dipendenti, quali le sirtuine, sembra avere un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo e della sopravvivenza cellulare, determinando un aumento della resistenza allo stress ossidativo e ritardando l'invecchiamento cellulare (Watroba & Szukiewicz, 2015).

## 1.2 LE SIRTUINE

Le sirtuine costituiscono una famiglia di proteine deacetilasiche  $\text{NAD}^+$  dipendenti, (III classe di HADC, deacetilasi istoniche) ovvero enzimi che rimuovono il gruppo acetilico da residui di lisina di substrati proteici o di istoni, in presenza del cofattore  $\text{NAD}^+$  (nicotinammide adenindinucleotide) (Denu, 2005).

La prima sirtuina, scoperta nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, è stata *SIR2*

(regolatore del silenziamento dell'informazione 2), la cui attività è quella di regolatore dell'espressione genica, in grado di silenziare l'espressione di alcuni geni ed estendere la durata della vita replicativa del lievito (Figura 1.1). Subito dopo la scoperta

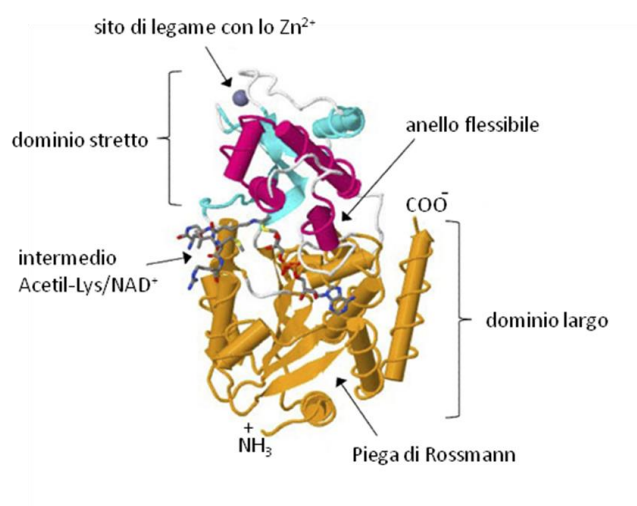


Figura 1.1: Struttura di *SIR2*.



di *SIR2*, sono stati trovati omologhi in numerosi organismi più evoluti, tra cui *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e nei mammiferi. Oggi sappiamo che le caratteristiche biochimiche delle sirtuine sono altamente conservate mentre i loro ruoli fisiologici differiscono tra le specie (Blander & Guarente, 2004; Nogueiras et al., 2012) (Figura 1.2).

	<i>SIRTUINE</i>	<i>attività enzimatica</i>	<i>target e substrati</i>	<i>localizzazione</i>	<i>funzione</i>
I		deacetilasi	p53, FOXO, PPAR, Ku-70, PARP, istoni, PGC1α, TIP60, p300, LKB1, NF-κβ...	nucleare/ citoplasmatica	riparazione danni al DNA, gluconeogenesi, lipolisi, resistenza allo stress ossidativo, biogenesi mitocondriale, inibizione della trascrizione genica e dell'apoptosi, secrezione dell'insulina...
		deacetilasi	α tubulina, FOXO	nucleare/ citoplasmatica	controllo del ciclo cellulare, deacetilazione di α tubulina
		deacetilasi	AceCS2, GDH, SDH, OTC, IDH2, FOXO3a, MnSOD, LKB1, p53, Ku-70	mitocondriale/ nucleare/ citoplasmatica	controllo enzimi coinvolti nel metabolismo e nella fosforilazione ossidativa, riparazione danni al DNA, blocco dell'apoptosi, resistenza allo stress ossidativo
II		ADP-ribosil transferasi	GHD	mitocondriale	secrezione dell'insulina
III		deacetilasi	CPSI	mitocondriale	ciclo dell'urea
IV		deacetilasi /ADP-ribosil-transferasi	elicasi, HIF1α, NF-κβ, Dna polimerasi β	nucleare	riparazione danni al DNA, funzioni telomeriche
		deacetilasi	RNA Polimerasi tipo 1, SMAD6	nucleare	trascrizione genica

Figura 1.2: Classificazione delle sirtuine, loro localizzazione e funzione.

Da un punto di vista biochimico, la principale peculiarità delle sirtuine consiste nella loro completa dipendenza catalitica da  $\text{NAD}^+$ : attraverso la sequenza centrale, la sirtuina è in grado di legare il cofattore  $\text{NAD}^+$  ed esercitare attività di ADP-ribosil transferasi e principalmente di deacetilasi su substrati proteici o su istoni producendo (Figura 1.3) il substrato proteico o istonico deacetilato, NAM (nicotinammide) e 2-O- acetil-ADP-Ribosio (Imai et al., 2000; Sauve et al., 2006).

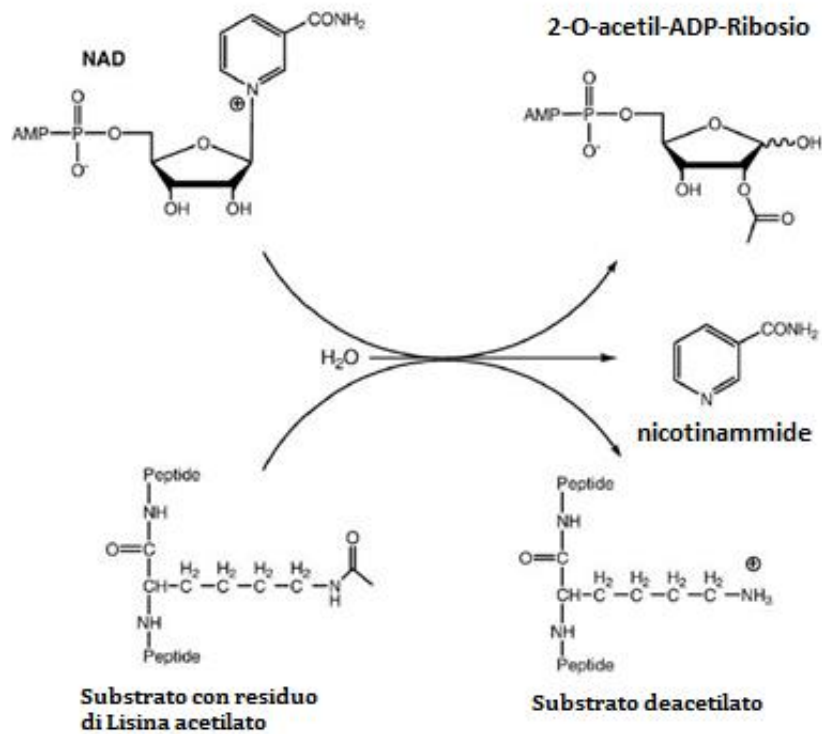


Figura 1.3: Reazione di deacetilazione catalizzata dalle sirtuine.

Come riportato in Figura 1.2, tutte le sirtuine hanno attività deacetilasica, ad eccezione di SIRT4, che presenta esclusivamente un'attività mono ribosil transferasica, e di SIRT6 che può svolgere entrambe le attività enzimatiche. Ogni sirtuina è caratterizzata anche da una propria localizzazione cellulare: SIRT1, SIRT6 e SIRT7 sono localizzate nel nucleo, dove funzionano principalmente da istoni-deacetilasi, influenzando epigeneticamente l'espressione genica; SIRT2 si trova prevalentemente nel citosol mentre SIRT3, SIRT4 e SIRT5 sono localizzate nei mitocondri, dove regolano le attività degli enzimi metabolici e moderano lo stress ossidativo che si genera in questo organello.

Poiché le sirtuine sono situate in compartimenti cellulari distinti, possono coordinare, attraverso il coinvolgimento di numerosi fattori trascrizionali, importanti processi metabolici cellulari, in tutto l'organismo: regolano l'omeostasi del glucosio e il ciclo cellulare; inibiscono l'apoptosi; favoriscono la secrezione dell'insulina; stimolano la biogenesi mitocondriale; mediano l'infiammazione, l'autofagia, il ritmo circadiano, la resistenza allo stress e il silenziamento cromatinico (Fiorino et al., 2004; Westerheide et al., 2009; Kucinskis et al., 2010). In Figura 1.4 sono riassunti i principali processi in cui sono coinvolte le sirtuine e le conseguenze indotte dalla loro attivazione.

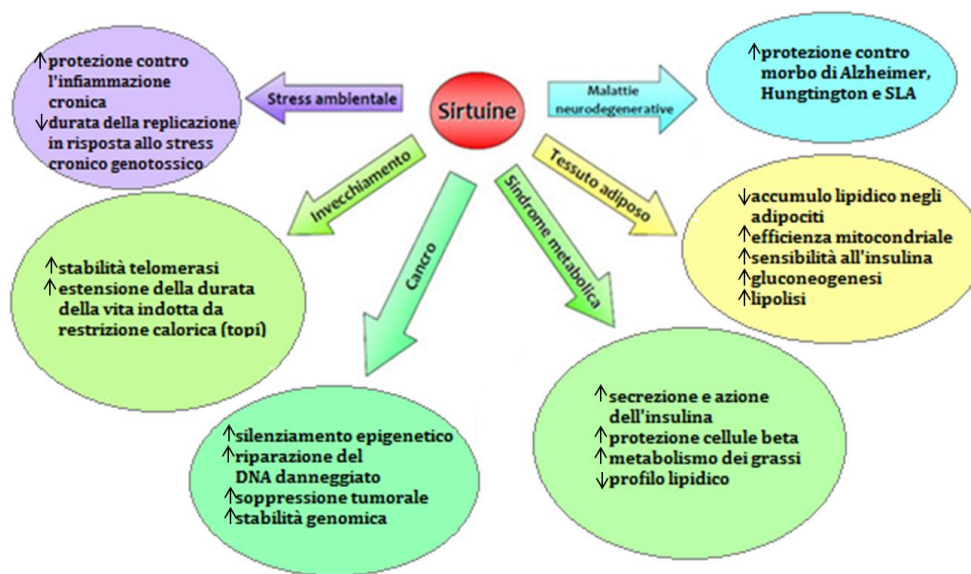


Figura 1.4: Schema riassuntivo delle conseguenze indotte dall'attività delle sirtuine (da: Michan & Sinclair, 2007).

Lo studio condotto in questa tesi parte dall'ipotesi originale, confermata da diversi lavori recenti (Noble et al., 1999; Furukawa et al., 2007; Braidy et al., 2015), secondo la quale le sirtuine sono proteine anti-invecchiamento, conservate, sensibili a particolari condizioni dell'organismo; restrizione calorica ed esercizio fisico incrementano l'attività intrinseca delle sirtuine, e sembrerebbe inoltre che siano in grado di attivare la loro trascrizione.

In quanto sensori energetici cellulari, le sirtuine vengono attivate o inibite da livelli variabili di molecole di  $\text{NAD}^+$  disponibili, e anche dai suoi intermedi ( $\text{NADH}$  e nicotinammide) (Nelson & Cox, 2006).

In linea generale, il fenomeno chiave, comune, sia in condizioni di restrizione calorica che durante l'esercizio fisico, è l'aumento della concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$  che, attraverso l'attivazione di molecole di segnalazione  $\text{Ca}^{2+}$  sensibili, influenza positivamente AMPK (proteina chinasi attivata da AMP). AMPK aumenta i livelli di  $\text{NAD}^+$  per *up regulation* di NAMPT (nicotinammide fosforibosil transferasi), un enzima cruciale per la biosintesi di  $\text{NAD}^+$ . L'incremento di molecole di  $\text{NAD}^+$  disponibili, si riflette dunque sull'attivazione delle sirtuine e sulla conseguente deacetilazione di numerosi fattori trascrizionali (Figura 1.5).

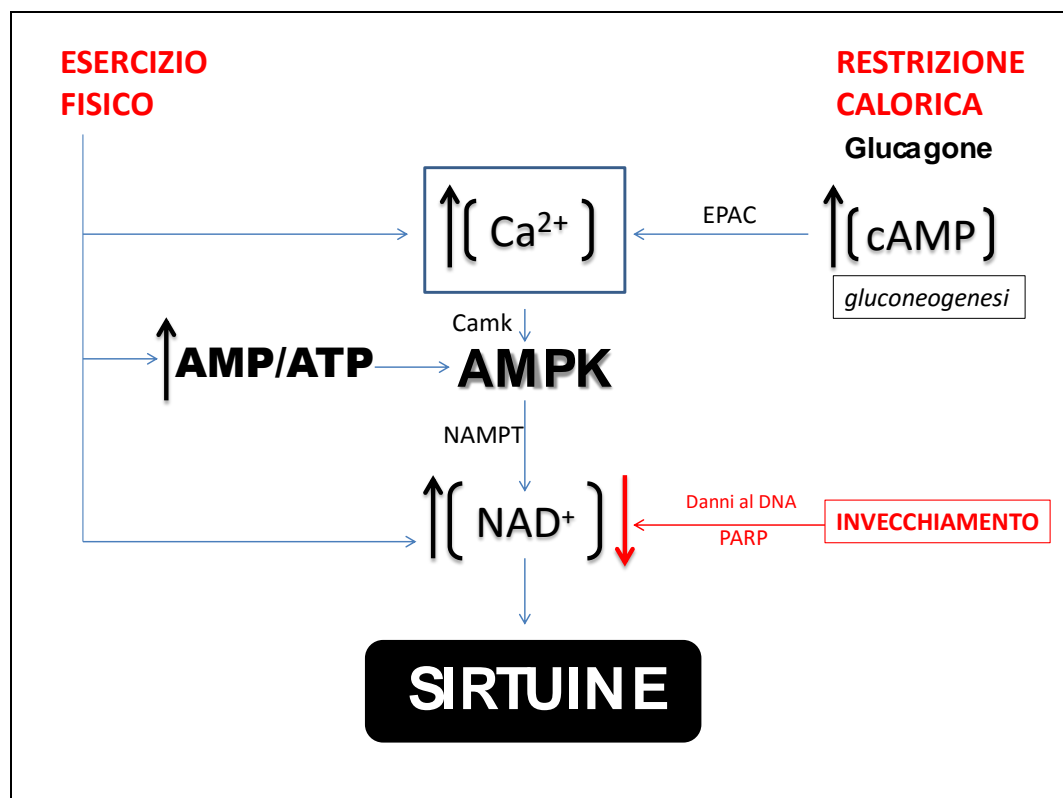


Figura 1.5: Vie di segnalazione per l'attivazione delle sirtuine. Esercizio fisico e restrizione calorica incrementano l'attività delle sirtuine; l'invecchiamento le inibisce. EPAC = proteina di scambio attivata dall'AMPc; Camk = protein chinasi calcio/calmodulina dipendente; PARP = poli ADP-ribosio polimerasi.

Durante il digiuno prolungato o in condizioni di restrizione calorica, il glucagone prodotto e in conseguente aumento di concentrazione intracellulare di AMPc spostano il metabolismo verso la glicogenolisi e la gluconeogenesi; in parallelo AMPc attiva direttamente EPAC (proteina di scambio attivata direttamente da AMPc) e la conseguente liberazione di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare porta all'attivazione delle sirtuine.

Durante l'esercizio fisico, l'aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, a cui segue l'attivazione di CamK (proteina chinasi calcio/calmodulina dipendente), porta all'attivazione di AMPK. Questa serina/treonina chinasi, agisce come sensore dello stato energetico della cellula attivandosi quando aumenta il rapporto AMP/ATP, come accade durante l'esercizio fisico per continua idrolisi di ATP; AMPK, a sua volta, determina l'aumento NAMPT-mediato di  $\text{NAD}^+$  e l'attivazione delle sirtuine.

L'invecchiamento e i danni al DNA ad esso correlati sottraggono molecole di  $\text{NAD}^+$ , disponibili per l'attività deacetilasica, per favorire l'attività di riparazione dei danni alle catene di DNA catalizzata da PARP (poli ADP-ribosio polimerasi), opponendosi così all'attivazione delle sirtuine (Koltai et al., 2010; Chang & Guarente, 2014).

### 1.2.1 SIRTUINA 1

SIRT1 è espressa ubiquitariamente in quasi tutti gli organi: fegato, pancreas, cuore, muscolo, rene, milza, polmone, testicolo, ovaia e cervello, dove è stata particolarmente rilevata, soprattutto nelle zone correlate a malattie neurodegenerative (corteccia prefrontale, ippocampo e gangli della base). (Ramadori et al., 2008; Dietrich et al., 2010).

La localizzazione subcellulare di SIRT1, come detto precedentemente, è prevalentemente nucleare; può trasferirsi nel citosol, o dal citosol ritornare nel nucleo, per mezzo di segnali di esportazione e di localizzazione nucleare, dai quali dipenderà l'entità citosolica o nucleare della sirtuina (Nogueiras et al., 2012).

I polimorfismi genetici del gene SIRT1, localizzato nel cromosoma 10q21.3, non sembrano essere correlati alla durata della vita cellulare (Flachsbar et al., 2006); recenti studi (Zillikens et al., 2009) hanno invece dimostrato una connessione tra le varianti geniche di SIRT1 e le sindromi metaboliche e l'obesità.

SIRT1 interagisce con una vasta gamma di substrati *target*, istoni e proteine non istoniche, regolandoli positivamente o negativamente, e modulando le diverse funzioni biologiche correlate: sviluppo e invecchiamento cellulare, metabolismo energetico, infiammazione e riparazione dei danni al DNA (Figura 1.6), di cui di seguito riportiamo una breve sintesi.

La deacetilazione SIRT1-mediata di **istoni** e acetiltransferasi **p300** e **TIP60** determina una diminuzione nei meccanismi di trascrizione aspecifici; la deacetilazione diretta di **p53** e l'inibizione indiretta di **p73**, mediante deacetilazione del fattore trascrizionale **E2F1**, bloccano i processi di apoptosi, svolgendo un ruolo chiave durante la carcinogenesi, diminuendo la velocità di crescita delle cellule neoplastiche, e durante la senescenza. L'interazione di SIRT1 con proteine coinvolte nella riparazione del DNA come **Ku-70** aumenta la loro attività di riparazione, promuovendo la sopravvivenza cellulare, ma inibisce i meccanismi apoptotici, per sequestro di fattori pro-apoptotici (Luo et al., 2001; Rathaus et al., 2009).

**FOXO1**, **3** e **4** sono fattori trascrizionali, appartenenti alla famiglia Forkhead, particolarmente sensibili alla disponibilità dei nutrienti. SIRT1 deacetila le proteine FOXO, aumentando la loro ritenzione nucleare (in condizioni fisiologiche, sono bloccate nel citosol in forma inattiva) e aumentando la loro attività trascrizionale nei confronti di geni che codificano per gli enzimi della

gluconeogenesi e di geni coinvolti nella resistenza allo stress ossidativo, nell'inibizione dell'apoptosi e nell'arresto del ciclo cellulare (Barthel et al., 2005; Vogt et al., 2005).

PPARs (recettori della proliferazione perossisomale) sono fattori di trascrizione nucleari appartenenti alla famiglia dei recettori steroidei, aventi varie isoforme tessuto-specifiche. **PPAR $\gamma$** , espressa nel tessuto adiposo, è coinvolta nel differenziamento degli adipociti e nell'anabolismo lipidico. **PPAR $\alpha$** , è espressa invece nei tessuti con un alto livello di catabolismo degli acidi grassi, come fegato, cuore e muscoli. Deacetilate da SIRT1, PPAR $\gamma$  e PPAR $\alpha$  inducono lipolisi, quindi mobilizzazione degli acidi grassi e  $\beta$ -ossidazione (Picard et al., 2004).

**PGC-1 $\alpha$**  è un coattivatore trascrizionale di recettori nucleari, espresso soprattutto nei tessuti ricchi di mitocondri e con un attivo metabolismo ossidativo. Oltre a favorire la gluconeogenesi epatica e la lipolisi, PGC-1 $\alpha$  deacetilata, agisce nel rimodellamento della composizione delle fibre muscolari (da glicolitiche a ossidative) (Herzig et al., 2001). Ciò che rende PGC-1 $\alpha$  un *master* regolatore rilevante è il suo coinvolgimento nei processi di biogenesi mitocondriale, in cui coordina l'espressione di fattori nucleari come NRF1 (fattore nucleare respiratorio 1), e di fattori mitocondriali come Tfam (fattore di trascrizione mitocondriale A). (Philp et al., 2011). Un incremento nella biogenesi mitocondriale PGC1 $\alpha$ -mediata è stata confermata anche a livello cerebrale, in studi in cui sono stati esaminati i parametri energetici e i parametri di misura dell'induzione alla neuro protezione nella corteccia e nell'ippocampo di ratti maschi adulti sottoposti ad un allenamento moderato su *tapis roulant* (Bayod et al., 2011).

Il fattore nucleare  $\kappa\beta$  (**NF- $\kappa\beta$** ), in forma dimerica p65/p50, regola l'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria e infiammatoria, nella proliferazione e nel differenziamento cellulare. SIRT1 inattiva p65, sensibilizzando le cellule all'apoptosi TNF- $\alpha$  – indotta. Sembra che SIRT1 possa giocare un importante ruolo neuroprotettivo nei confronti di malattie neurodegenerative quali la sindrome di Alzheimer (Pfluger et al., 2008).

L'attività deacetilasica di SIRT1 può condizionare anche l'attività di altre molecole *target*: inibisce **SREBP-1c** (proteine leganti elementi regolatori dello sterolo), bloccando la sintesi di colesterolo nel fegato; inibisce la proteina disaccoppiante **UCP2** e la proteina **PTP1B** (proteina tirosina fosfatasi) che,

deacetilate, aumentano la secrezione dell'insulina e la sensibilità ad essa; incrementa l'attività di recettori nucleari, quali **LXR**s (recettore epatico X), che agiscono come sensori del colesterolo (Li et al., 2007; Sun et al., 2007). Infine, l'interazione/competizione tra SIRT1 e **PARP1** (poli ADP-ribosio polimerasi NAD<sup>+</sup> - dipendente), attivato per danni al DNA, soprattutto durante la senescenza, può condurre ad esiti di sopravvivenza cellulare o di morte cellulare. (Kolthur-Seetharam et al., 2006).

Per quanto riguarda la regolazione di SIRT1, oltre all'attivazione classica, descritta in precedenza, per aumento del rapporto NAD<sup>+</sup>/NADH, si riconoscono altri processi endogeni in grado di regolarne l'attività deacetilasica (Figura 1.6). La trascrizione di SIRT1 può essere controllata da una serie di fattori di trascrizione come **E2F1** e **c-Myc**, coattivatori trascrizionali, o repressori come **p53** e il regolatore di crescita **HIC1**. Inoltre la stabilità di mRNA SIRT1 dipende dalla presenza di proteine leganti RNA (**HuR**) e di specifici microRNA (**miR-34a**) che, legandosi al 3'UTR di mRNA SIRT1 ne impediscono la traduzione. Infine, l'attività di SIRT1 può essere regolata da modificazioni post-traduzionali, determinate da interazioni proteina-proteina che possono stimolare (SIRT1/**AMPK** o **AROS**) o reprimere (SIRT1/**DBC1** o **PARP**) l'attività di SIRT1. Poiché la maggior parte di questi regolatori endogeni di SIRT1 sono target di SIRT1 stessa, si vengono a generare meccanismi a *feedback* positivi o negativi, capaci di amplificare il segnale o funzionare da interruttori molecolari (Nogueiras et al., 2012).



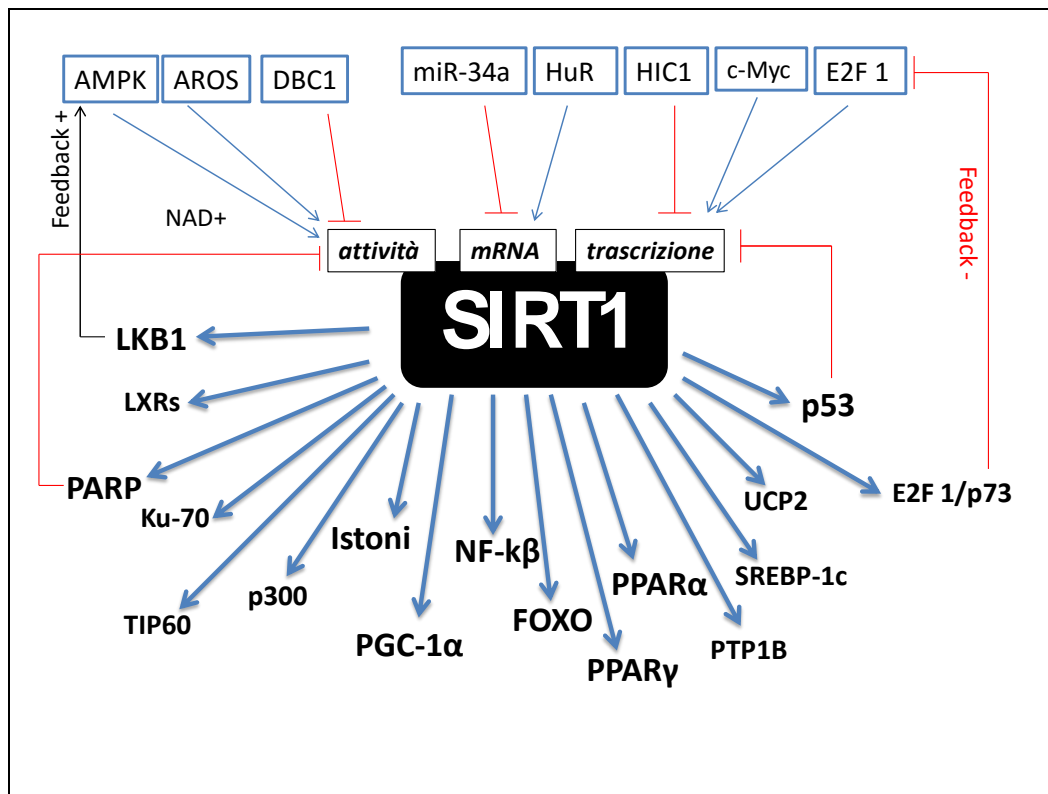


Figura 1.6: Regolatori e molecole *target* di SIRT1, generanti meccanismi a *feedback*. HIC1(oncosoppressore, *hypermethylated in cancer1*), HuR (proteina legante Rna ubiquitariamente espressa), miR-34a (microRNAs), DBC1(*deleted in breast cancer 1*), AROS (regolatore attivo di SIRT1).

—| (inibizione, meccanismo a *feedback* negativo); → (attivazione, meccanismo a *feedback* positivo SIRT1-LKB1-AMPK ,vedi nota2); → (attività deacetilasica).

### 1.2.2 SIRTUINA 3

Come la SIRT1, nei mammiferi, SIRT3 è espressa in una varietà di tessuti, metabolicamente attivi: studi su topo hanno evidenziato una maggiore espressione di SIRT3 nei reni, nel grasso bruno, nel cervello, nel cuore, nel fegato e nel muscolo scheletrico (Jin et al., 2009).

A livello subcellulare, SIRT3 è principalmente localizzata all'interno delle creste della membrana mitocondriale e nella matrice; la sua sequenza segnale permette alle isoforme integre, nucleari o citoplasmatiche, di traslocare all'interno dei mitocondri, dove subiscono clivaggio, determinando le isoforme tronche di SIRT3 (Schwer et al., 2002; Kincaid et al., 2013).

Il gene *sirt3* è localizzato nella parte telomerica terminale, sul cromosoma 11p15.5. Studi effettuati su soggetti anziani, hanno valutato una correlazione tra longevità e polimorfismo del gene *sirt3*: analizzando la frequenza allelica in relazione all'età e all'allenamento fisico, i ricercatori hanno dimostrato che due SNPs (polimorfismi a singolo nucleotide) di *sirt3* incidono positivamente sulla respirazione cellulare, e che soggetti anziani, con uno stile di vita sedentario, mostrano bassi livelli di espressione di *sirt3* (Lanza et al., 2008; Pillai et al., 2010).

Ad oggi ancora si sa poco circa il ruolo fisiologico di SIRT3, nonostante siano stati identificati un certo numero di substrati bersaglio della sirtuina, lasciando presagire un coinvolgimento importante della proteina nel metabolismo ossidativo mitocondriale, nella regolazione dell'omeostasi energetica, nello stress ossidativo e, in generale, nel danno cellulare. Topi *knock-out* (KO) per *sirt3* sembrano mostrare gravi disordini legati all'invecchiamento, sindromi metaboliche, cancro e difetti cardiaci e neurologici (Jing et al., 2011).

L'attività deacetilasica citoplasmatica e nucleare di SIRT3 nei confronti di **p53** e di **ku70** sembra avere un ruolo rilevante a livello cardiaco: SIRT3 protegge i cardiomiociti dallo stress ossidativo e dalla morte cellulare e, in ultima analisi, inibisce l'ipertrofia cardiaca e preserva la capacità di biosintesi del cuore. Le azioni di SIRT3 sui cardiomiociti sono state anche dimostrate in vivo, su topi privi di SIRT3, che mostrano segni di ipertrofia cardiaca a 8 settimane dalla nascita (Sundaresan et al., 2009).

A livello mitocondriale, SIRT3 deacetila le proteine coinvolte nel metabolismo e nella fosforilazione ossidativa attivando **AceCS2** (Acetil-CoA sintetasi 2), **GDH** (Glutammato deidrogenasi), **SDH** (Succinato deidrogenasi), **OTC** (Ornitina transcarbamilasi), **IDH2** (Isocitrato deidrogenasi) (Someya et al., 2010).

Durante l'esercizio fisico, il fattore **FOXO3a** trasloca nel mitocondrio, diventando *target* dell'attività di SIRT3; FOXO3a deacetilato e attivato, si lega al mtDNA e promuove la trascrizione di catalasi e di **MnSOD** (Manganese superossido dismutasi), che è a sua volta *target* di SIRT3, che deacetilandola la attiva (Jacob et al., 2008) (Figura 1.7).

Per quanto riguarda la regolazione a monte di SIRT3, oltre alla disponibilità di molecole di  $\text{NAD}^+$ , SIRT3 subisce una regolazione dinamica sulla base di determinati regimi ambientali; un'alimentazione ad alto contenuto di grassi, ad esempio, sembra ridurre l'attività di SIRT3, mentre l'attività fisica, sembra incrementare i livelli di mRNA di SIRT3 (Palacios et al., 2009).

Recenti studi (Kong et al., 2010), hanno evidenziato come l'unico elemento chiave che gioca un ruolo nel controllo di espressione del gene *sirt3* sia il coattivatore trascrizionale **PGC1 $\alpha$** . L'esercizio fisico aumenta il rapporto AMP/ATP e, conseguentemente, viene incrementata l'attività della serina-treonina chinasi AMPK che va a fosforilare CREB (proteina legante elementi di risposta all'AMPc). AMPK e CREB aumentano rispettivamente l'attività e l'espressione genica di PGC1 $\alpha$ , che a sua volta favorisce l'espressione del gene *sirt3* mediante la trascrizione di un recettore nucleare connesso agli estrogeni (ERR $\alpha$ ), il quale si lega al promotore del gene *sirt3* e ne favorisce la trascrizione (Kincaid et al., 2013).

Tra i *target* deacetilati e attivati da SIRT3, la chinasi **LKB1** (chinasi epatica B1) fosforila e attiva AMPK, chiudendo il ciclo e amplificando il segnale, attraverso un meccanismo a *feedback* positivo<sup>2</sup> (Pillai et al., 2010).

---

<sup>2</sup> Il meccanismo a *feedback* positivo SIRT3-LKB1-AMPK è aspecifico; si genera anche nei processi che coinvolgono l'attività deacetilasica di SIRT1, amplificandone il segnale, essendo LKB1 un *target* di entrambe le sirtuine (Lan et al., 2008).

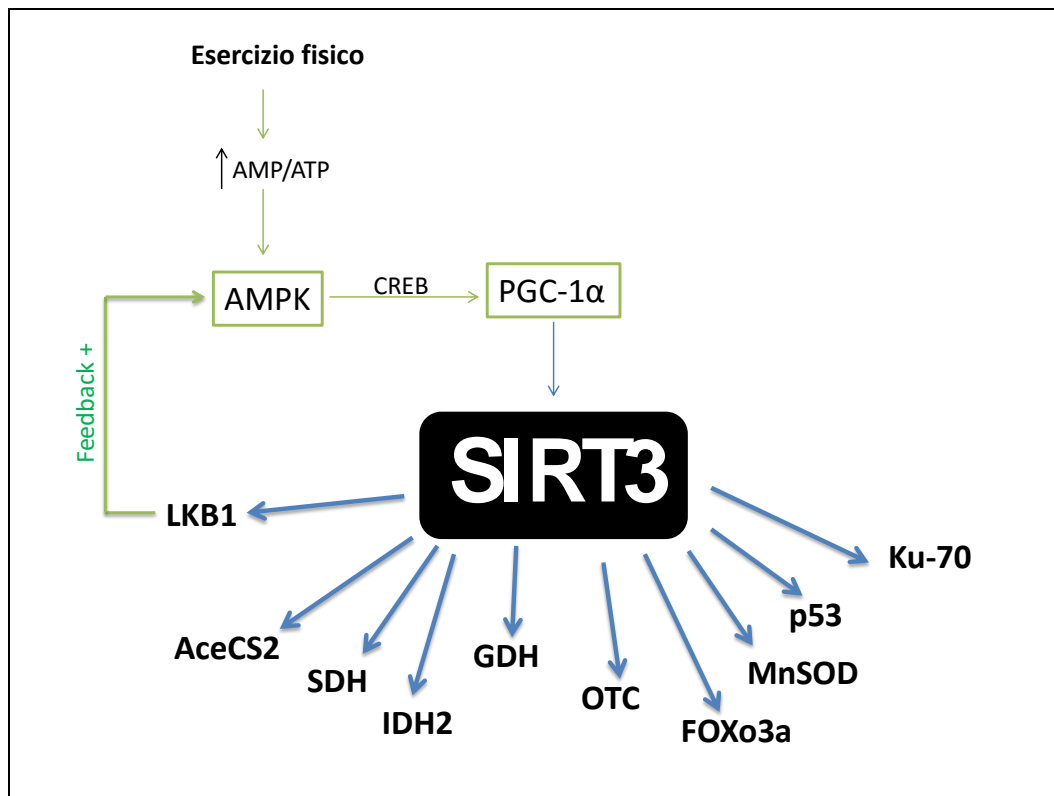


Figura 1.7: Meccanismo di regolazione di SIRT3 e molecole *target*.

### 1.3 SIRTUINE E ROS

Come descritto precedentemente, PGC1 $\alpha$  svolge un ruolo decisivo nei meccanismi di biogenesi mitocondriale. Sia SIRT3 che SIRT1 promuovono la biogenesi, ma in modi diversi: SIRT1 deacetila e attiva direttamente PGC1 $\alpha$ ; SIRT3 ne promuove indirettamente l'espressione genica (Palacios et al., 2009).

Durante l'esercizio fisico, un aumento dei livelli di attività di entrambe le sirtuine favorisce la biogenesi mitocondriale, che rappresenta la risposta adattativa dominante nei riguardi della plasticità metabolica. Alterazioni della biogenesi mitocondriale possono derivare da un incremento del numero dei mitocondri per grammo di tessuto e/o da un cambiamento nella composizione mitocondriale (rapporto proteine/lipidi mitocondriali). Questi cambiamenti sono il risultato di molteplici eventi molecolari (trascrizione di geni nucleari, importazione di prodotti genici nucleari all'interno degli organelli, replicazione e trascrizione di mtDNA, traduzione di mRNA in proteine e corretto assemblaggio di proteine in una stechiometria funzionale) favoriti dall'attività di PGC1 $\alpha$  deacetilata (Hood et al., 2006). L'attività fisica influenza anche la dinamicità dei mitocondri, a favore dei meccanismi di fusione, inibendo un fattore chiave che porta alla scissione mitocondriale.

Al fine di migliorare il metabolismo energetico delle cellule e rallentare così l'invecchiamento incrementando la durata della vita, è necessario operare una riduzione dell'attività dei radicali liberi e dello stress ossidativo. I dati dimostrano che le sirtuine, attraverso l'attivazione o l'inibizione di alcune delle molecole *target*, modulano i principali enzimi antiossidanti (Merksamer et al., 2013) (Figura 1.8). In particolare, SIRT1: i) promuove la trascrizione FOXO3-mediata di geni di risposta allo stress, tra cui la superossido dismutasi **SOD2**; ii) mediante PGC1 $\alpha$ , favorisce l'espressione dei geni **glutathione perossidasi**, **catalasi** e manganese superossido dismutasi (**MnSOD**); iii) inattivando la subunità p65 di NF- $\kappa$ B, sopprime l'attività della sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (**iNOS**), abbassando quindi i livelli di ROS cellulari.

Gli effetti di SIRT3 sono invece mediati dalla sua interazione con l'enzima antiossidante **MnSOD**, che riduce i livelli di superossido trasformandolo in perossido di idrogeno, e con **IDH2**, il quale promuove la conversione di NADP<sup>+</sup> in NADPH, fornendo gli equivalenti riducenti per formare **glutathione ridotto**, a partire dalla sua forma ossidata. Il glutathione agisce come uno dei maggiori

antiossidanti nelle cellule. Inoltre l'attività antiossidante di SIRT3 si traduce anche nell'inibizione di **HIF1 $\alpha$**  (fattore ipossia inducibile 1 $\alpha$ ), sopprimendo la crescita e la proliferazione di cellule tumorali.

Studi condotti in topi *KO* per le SIRTs dimostrano che nei loro fibroblasti embrionali si hanno più elevati livelli di ROS, maggiore instabilità genomica e sensibilità alle trasformazioni oncogene rispetto ai fibroblasti dei topi *wild-type* (Kim et al., 2010).

Durante l'invecchiamento, la ridotta attività delle sirtuine comporta un accumulo, a valle, del glutathione ossidato, che altera il rapporto GSH/GSSG, inducendo stress ossidativo (Finkel & Holbrook, 2000).

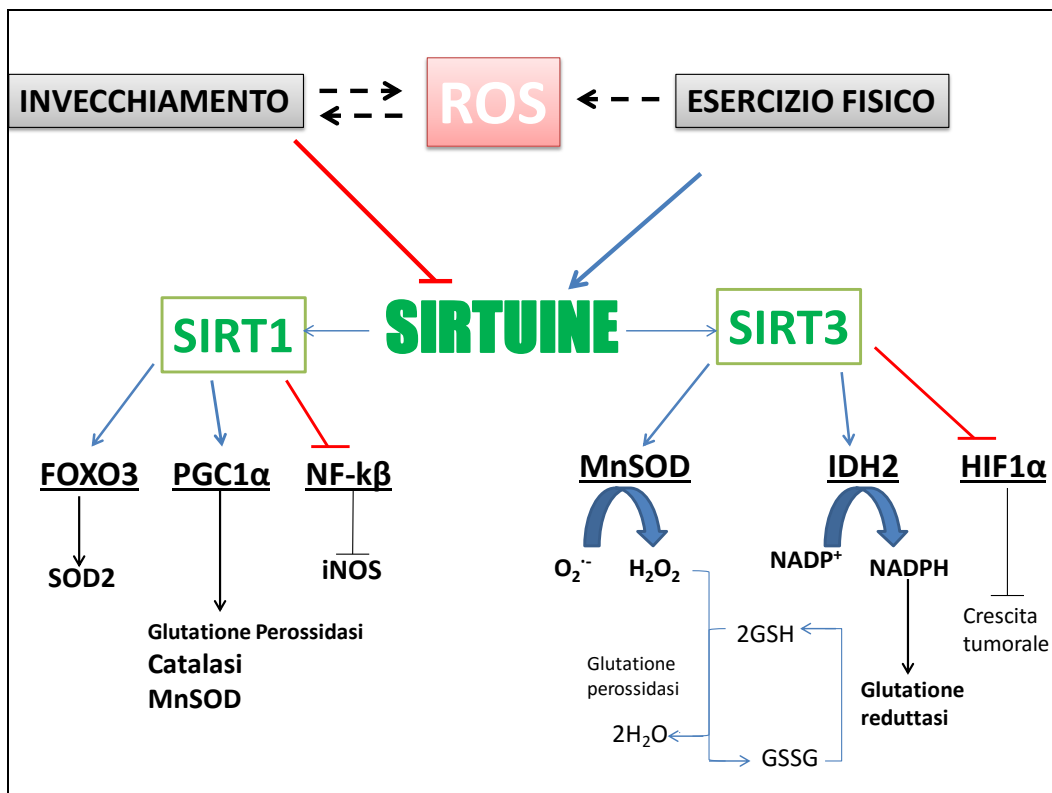


Figura 1.8: Attività antiossidante indiretta delle sirtuine. GSH = Glutathione ridotto; GSSG = Glutathione ossidato

Lo schema rappresentato in Figura 1.8 mette in evidenza che durante l'esercizio fisico o in condizioni di restrizione calorica, i livelli di ROS incrementano per aumento della biogenesi mitocondriale e della respirazione mitocondriale, ma al tempo stesso la maggiore quantità di ROS induce una limitazione dello stress ossidativo attraverso le attività antiossidanti sirtuine-indotte.

Questi meccanismi, apparentemente contrapposti, si basano sul concetto di “*preconditioning*” o ormesi: in riferimento alla nota 1 e alla Figura 1.9, nella curva di risposta allo stress, viene definita una zona ormetica, all’interno della quale livelli moderati di “fattori di stress” agiscono nel suscitare una risposta adattativa allo stress e promuovono la sopravvivenza cellulare, attraverso la trascrizione delle sirtuine; dosi elevate risultano invece nocive (Kincaid et al., 2013).

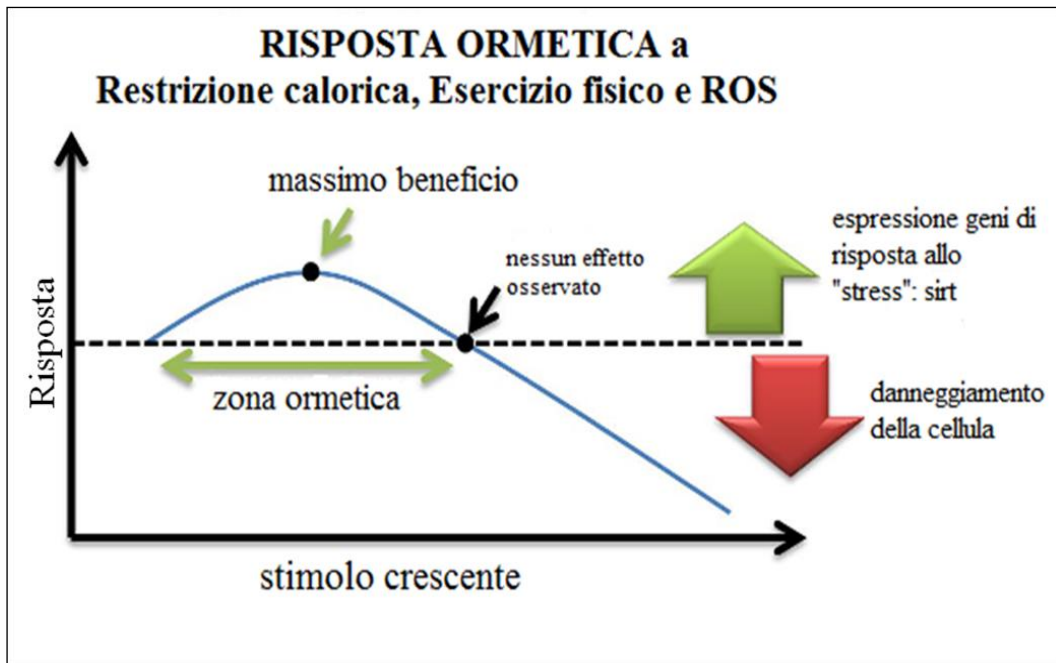


Figura 1.9: Curva di risposta ormetica.

## 1.4 NEUROTROFINE ED ESERCIZIO FISICO

Da un punto di vista neurobiologico, l'attività fisica cronica migliora la salute del cervello. A dimostrarlo sono i diversi lavori (Dishman et al., 2006; Liu et al., 2009; Baiod et al., 2011), condotti sui ratti, che evidenziano un aumento di espressione delle neurotrofine in diverse aree cerebrali a seguito di un regolare e moderato esercizio fisico (*treadmill running* o *wheel running*, 5 giorni a settimana, per 3-36 settimane). Sembra infatti che un maggior apporto di ossigeno al cervello attivi, attraverso specifiche vie di segnalazione molecolari, alcune molecole *target*, come CREB, NOS, IGF-1 (fattore di crescita insulino-simile), proteina disaccoppiante mitocondriale UCP-2 e corticosteroidi, che modulano positivamente i livelli di espressione di BDNF (fattore neurotrofico derivante dal cervello), favorendo così la sopravvivenza e la funzionalità dei neuroni, oltre che migliorare la plasticità sinaptica. Radak e collaboratori (2006), mettendo a confronto ratti allenati e ratti sedentari, hanno dimostrato come in questi ultimi ci sia una riduzione dell'espressione delle neurotrofine nei nuclei paraventricolari. Alcuni studi (Neeper et al., 1996; Hong et al., 2015) mostrano come nei ratti l'attività fisica induca un incremento dei livelli di mRNA di BDNF e di NGF (fattore di crescita neuronale), principalmente nell'area cerebrale dell'ippocampo, migliorando alcune funzioni cognitive, soprattutto apprendimento e memoria, ma anche quei processi che portano ad un maggiore controllo esecutivo quali la programmazione, il monitoraggio, la pianificazione e il coordinamento dell'attività motoria.

Nell'uomo, in un lavoro condotto su soggetti anziani allenati (Colcombe et al., 2004) è stata esaminata, mediante risonanza magnetica ad alta risoluzione, la densità corticale della materia grigia e bianca: è stato dimostrato come l'aumento della *fitness* cardiovascolare, a seguito di un costante allenamento aerobico, riduca la perdita di materia nei lobi frontali, temporali e parietali, aiutando a proteggere il tessuto cerebrale dai danni del tempo.

Queste osservazioni pongono le basi per considerare l'esercizio fisico un buon "rimedio" contro l'invecchiamento.



## 2. SCOPO DELLA TESI

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare gli effetti di un periodo di allenamento moderato e costante, su ratti maschi adulti, messi a confronto con ratti maschi adulti mai allenati, al fine di definire i meccanismi biologico-molecolari stimolati dall'attività fisica, che possono rallentare i processi di invecchiamento.

I processi di invecchiamento sono correlati ad un accumulo cellulare dei radicali liberi, per ridotta capacità antiossidante. I mitocondri, potentissimi generatori di ROS, con il procedere dell'età, diventano meno efficienti, l'attività di molti sistemi *scavenger* diminuisce e si iniziano ad accumulare, negli anni, danni al mtDNA. Questo implica un circolo vizioso, dove l'ulteriore produzione di ROS e l'accumulo di danno ossidativo inducono le cellule ad apoptosi e alterano i tessuti a livello strutturale e funzionale.

È ormai chiaro che l'esercizio fisico ha effetti benefici, soprattutto in soggetti anziani: l'attività fisica inibisce i processi di invecchiamento, limitando i danni legati allo stress ossidativo, per aumento delle capacità antiossidanti delle cellule "adulte".

In questo contesto, l'attività deacetilasica di proteine NAD<sup>+</sup>-dipendenti, quali le sirtuine, sembra avere un ruolo chiave, oltre che in molti aspetti del metabolismo e della sopravvivenza cellulare, nel condizionare positivamente specifiche molecole *scavenger*, aumentandone la loro attività antiossidante nei confronti delle varie specie radicaliche. Dal momento che l'esercizio fisico induce un aumento dei livelli di molecole NAD<sup>+</sup> disponibili, aumentando dunque l'attività delle sirtuine, scopo del presente studio è stato quello di analizzare il ruolo di proteine anti-invecchiamento delle SIRT, attraverso:

- 1) la valutazione delle variazioni dell'espressione genica di sirt1 e sirt3 in campioni di tessuto muscolare scheletrico, cardiaco, epatico e porzioni ippocampali, isolati da ratti allenati su ruota motorizzata per 6 settimane, e ratti sedentari;
- 2) l'analisi diretta dell'attività antiossidante presente nell'ippocampo, in maniera selettiva nei confronti delle varie specie radicaliche, sia nei ratti allenati che nei ratti sedentari.

È stata inoltre valutata l'espressione del gene che codifica per la neurotrofina NGF nell'ippocampo dei ratti allenati e dei ratti sedentari, al fine di ottenere una conferma che l'esercizio fisico migliora la salute del cervello.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 ANIMALI

In questo studio sono stati utilizzati ratti Wistar albin, maschi (età: 3-5 mesi; Charles River, Calco, Italia), di peso corporeo medio di 300 gr. La manipolazione e la cura degli animali sono state effettuate in accordo con le linee guida della Commissione per la Ricerca e Materie Etiche della IASP, con la legge nazionale italiana sull'uso degli animali per la ricerca (DL116/92, applicazione della Direttiva del Consiglio delle Comunità Europee 86/609/EEC), e sono state approvate dal comitato etico dell'Ateneo di Pisa (n. protocollo 00 4896/2013).

Gli animali sono stati stabulati singolarmente e mantenuti in condizioni standard di stabulazione: temperatura ( $24\pm1^{\circ}\text{C}$ ) e umidità ( $60\pm5\%$ ) costanti, libero accesso ad acqua e cibo e sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce/buio di 12 ore (Figura 3.1).



Figura 3.1: Gabbie per la stabulazione dei ratti utilizzati per gli esperimenti.

Gli otto ratti utilizzati in questo studio, sono stati casualmente divisi in due gruppi: cinque ratti sono stati sottoposti ad allenamento (allenati), i restanti 3 ratti (sedentari) non sono mai entrati nell'apparato di allenamento.

### 3.2 ALLENAMENTO

I ratti che sono stati allenati hanno compiuto attività motoria moderata e costante per 6 settimane, sottoponendosi ad uno specifico programma di allenamento 3 volte a settimana, per un totale di 18 sessioni di allenamento (vedi oltre). In ogni sessione, ciascun animale veniva portato dalla stanza di stabulazione alla stanza di allenamento, lasciato ambientare per 15 minuti, e quindi prelevato manualmente dalla gabbia di stabulazione e posto all'interno di un apparato di allenamento appositamente costruito (Figura 3.2).



Figura 3.2: Apparato impiegato per l'allenamento dei ratti.

Come mostra la figura 3.2, l'apparato era costituito da una ruota di plastica, di diametro 42 cm, chiusa posteriormente e forata lungo tutta la superficie esterna, in modo che aria e luce penetrassero all'interno. Anteriormente un pannello in plexiglass trasparente dello stesso diametro della ruota delimitava un corridoio lungo il quale l'animale era costretto a camminare, seguendo il movimento rotatorio della ruota. Sul pannello è stato ricavato uno sportellino apribile esternamente (con chiusura a calamita), per consentire l'ingresso e l'uscita dell'animale.

Un piedistallo in materiale metallico, alto 36 cm, sorreggeva un'asta di ferro, lunga 40 cm, che si inseriva centralmente nella ruota, per supportare l'intera struttura e consentire il movimento rotatorio attorno ad essa, in entrambe le direzioni (antiorario e orario). Il movimento rotatorio era impresso da una cinghia dentata, connessa ad un motorino elettrico passo-passo (US Digital, Washington 98684, USA), azionato da un sistema computerizzato appositamente costruito (Figura 3.3).

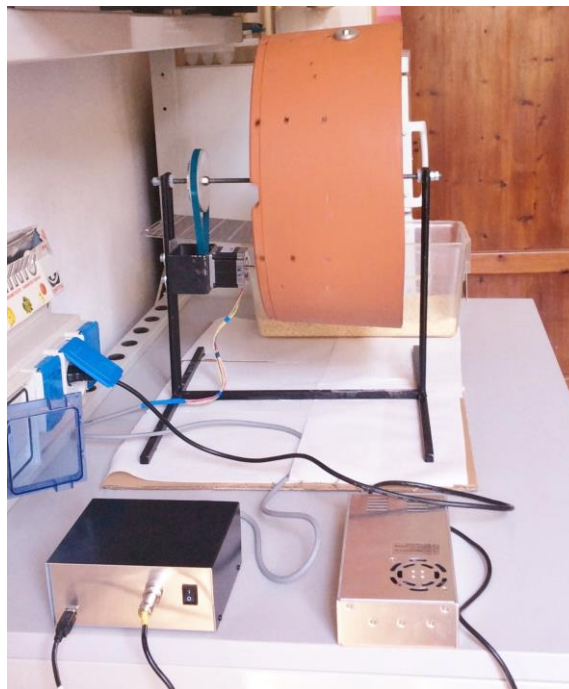


Figura 3.3: Dispositivi elettrici necessari per imprimere alla ruota il movimento circolare.

Il sistema computerizzato, mediante un *software* dedicato e programmato sul sistema *LAB VIEW* (National Instruments S.R.L., Milano, Italia), consentiva all'operatore di gestire il movimento rotatorio della ruota, stabilendo il senso di

rotazione (orario o antiorario), la velocità di rotazione (espressa in m/min) e il tempo di rotazione (min), e di acquisire in tempo reale lo spazio percorso (m).

I dati registrati sono stati memorizzati su tabella, per essere successivamente analizzati *offline*.

Ogni ratto allenato, prima di iniziare il programma di allenamento, ha trascorso una settimana di adattamento: inizialmente (primi due giorni) veniva lasciato libero di esplorare e di muoversi all'interno della ruota, priva di collegamento al *software*; nei giorni successivi, la ruota veniva azionata lentamente (4-5 m/min) per consentire al ratto di coordinare la propria andatura con la velocità di rotazione dell'apparato.

Trascorsi 3-4 giorni di adattamento al movimento, gli animali hanno mostrato la capacità di seguire il movimento della ruota, camminando di continuo per 30 minuti.

A questo punto poteva iniziare il programma di allenamento così strutturato:

- i- 3 sessioni settimanali, a giorni alterni (lunedì, mercoledì e venerdì);
- ii- tutte le sessioni di allenamento avvenivano sempre tra le ore 10:00 e le ore 15:00, per ridurre le influenze circadiane;
- iii- il ratto, all'inizio della sessione, veniva lasciato indisturbato e autonomo nel movimento per i primi 5 minuti, dopo i quali l'operatore dava l'avvio al movimento motorino-indotto della ruota;
- iv- ogni sessione di allenamento aveva una durata di 30 minuti, durante i quali la velocità di rotazione veniva incrementata di 1m/min, ogni 15 minuti. Come schematizzato nella Figura 3.4, la velocità raggiunta alla fine dei 30 minuti, in ogni singola sessione (dalla sessione 1 alla sessione 15), risultava essere la velocità con cui veniva avviata la sessione successiva. In tal modo, partendo da una velocità iniziale di 5 m/min (sessione1), sessione dopo sessione, si è raggiunta la velocità di 20 m/min, alla fine della V settimana. L'incremento raggiunto nella sessione 15, è stato mantenuto anche durante le ultime tre sessioni nella VI settimana di allenamento.

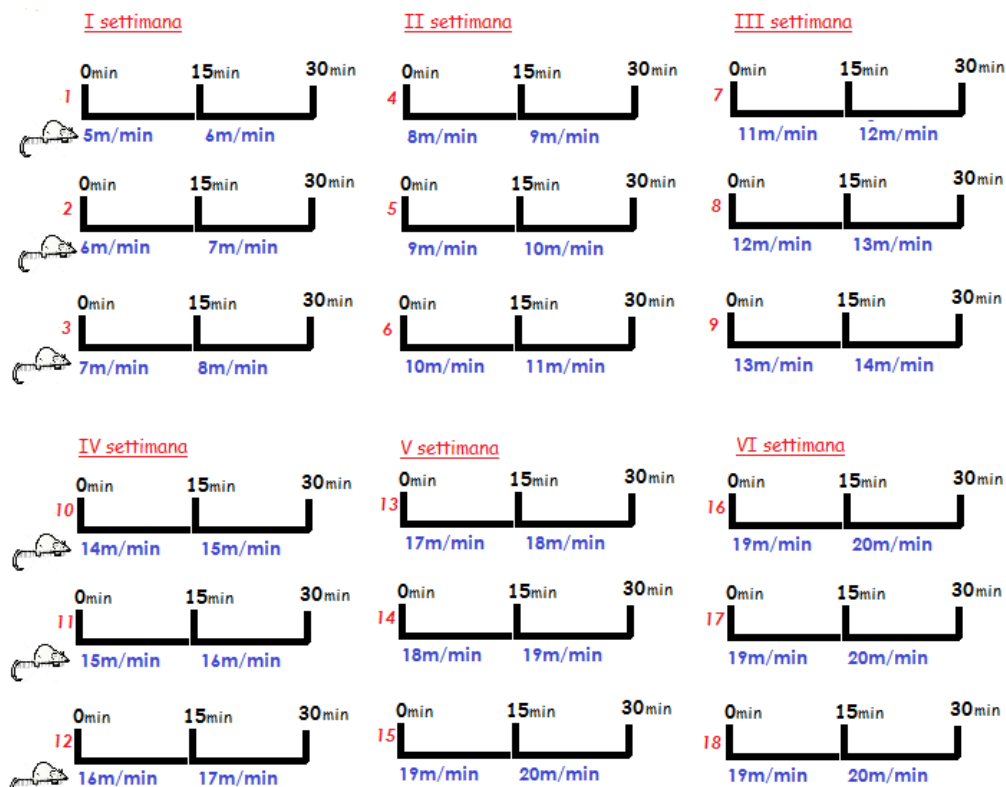


Figura 3.4: Programma delle sei settimane di allenamento.

Al termine di ogni singola sessione di allenamento, l'animale veniva riposto nella propria gabbia di stabulazione e riportato nello stabulario.

I ratti sedentari, invece, sono stati portati nella stanza di allenamento insieme ai ratti allenati, ogni sessione, ma sono stati lasciati nella loro gabbia di stabulazione per tutta la durata dell'allenamento.

### 3.3 ISOLAMENTO E CONSERVAZIONE DEI TESSUTI

Una settimana dopo l'ultima sessione di allenamento, tutti gli animali (ratti allenati e ratti sedentari) sono stati sacrificati, tramite decapitazione, dopo essere stati anestetizzati con etere. In condizioni sterili e sotto cappa microbiologica a flusso laminare, il cervello è stato immediatamente rimosso dalla scatola cranica, e mantenuto in ghiaccio, ottenuto da soluzione fisiologica congelata; quindi si è proceduto alla dissezione del tessuto cerebrale per ottenere sezioni comprendenti l'ippocampo. Contemporaneamente sono state prelevate porzioni di fegato, tessuto cardiaco e tessuto muscolare scheletrico (muscolo gastrocnemio).

Ogni porzione di tessuto ottenuta è stata divisa in due campioni: un campione è stato conservato in eppendorf da 1,5 ml a  $-80^{\circ}\text{C}$ , per essere successivamente utilizzato per analisi trascrizionali (vedi par. 3.5); l'altro campione è stato posto in ghiaccio e immediatamente omogenato per essere utilizzato nell'analisi TOSCA (vedi par. 3.4).

### 3.4 ANALISI TOSCA (*Total oxyradical Scavenging capacity assay*)

Ogni campione destinato all'analisi TOSCA è stato omogenato manualmente con *Potter* da 5 ml, in vetro, dalla forma cilindrica e con pistoni in Teflon (Figura 3.5), in rapporto 1 g di tessuto / 4 ml di soluzione tampone, costituita da: 50 mM di tampone fosfato di potassio a pH 7,5; inibitori di proteasi (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets*; Complete Mini-Roche Diagnostics, USA) a concentrazione 1x e NaCl 1,8% (p/v).



Figura 3.5: *Potter* manuale da 5 ml impiegato per l'omogenizzazione dei tessuti.



L'omogenato ottenuto è stato sottoposto a ultracentrifugazione secondo il seguente protocollo:

I centrifuga - 25 min a 13.500 xg, che ha consentito il recupero di surnatante, comprendente frazione citosolica + frazione microsomiale;

II centrifuga - 1h:46 min a 100.000 xg, che ha consentito il recupero di surnatante, comprendente la sola frazione citosolica.

La frazione citosolica è stata aliquotata in eppendorf e stoccata a -80°C per le successive analisi TOSCA.

La tecnica TOSCA (*Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay*), permette un'analisi diretta dell'attività *scavenger* dei campioni ottenuti, verso i radicali liberi (Regoli & Winston, 1999). Il saggio è basato sulla reazione tra le varie specie radicaliche, perossilici (ROO·), idrossilici (·OH) e derivati del perossinitrito (ONOO·), generate artificialmente a regime costante, con l'acido  $\alpha$ -cheto- $\gamma$ -metiolbutirrico (KMBA); in presenza di radicali, il KMBA si ossida e produce etilene, che viene dosato mediante gascromatografia.



Sulla base dell'etilene prodotto, viene calcolata la capacità antiossidante del campione, a confronto con una reazione di controllo: l'antiossidante presente nel campione compete con il KMBA nella reazione con i radicali liberi, quindi la produzione di etilene risulta minore rispetto alla reazione di controllo, in cui non sono presenti molecole antiossidanti.

Etilene Campione (Antiossidante) << Etilene Controllo (no Antiossidante)

Per i tre diversi sistemi di generazione dei radicali dell'ossigeno, sono necessarie adeguate condizioni di saggio:

- i radicali perossilici sono stati generati dall'omolisi termica di 2,2'-azo-bis-ammidinopropano (ABAP) 20 mM, a 35°C, in soluzione tampone di fosfato di potassio 100 mM, a pH 7,4;
- i radicali idrossilici sono stati generati a 35°C, secondo la reazione di Fenton modificata, con  $\text{Fe}^{3+}$  1,8  $\mu\text{M}$ , EDTA 3,6  $\mu\text{M}$  e acido ascorbico 1,8  $\mu\text{M}$ , in soluzione tampone di fosfato di potassio 100 mM, a pH 7,4;

- i radicali di derivazione del perossinitrito, sono stati generati a 35°C a partire dalla decomposizione del SIN-1 (3-morfolinosidnonimine N-etilcarbammide) in un tampone fosfato di potassio 100 mM (pH 7,4) con DTPA (acido dietilene-triamina-pentaacetico) 0,1 mM.

Le reazioni con KMBA 0,2 mM, sono state effettuate in specifici contenitori in vetro da 10 ml sigillati con valvole a tenuta di gas costante Mininert® (Supelco, Bellefonte, PA,USA), in un volume finale di 1 ml (Figura 3.6).



Figura 3.6: Specifici contenitori in vetro da 10 ml, con valvole a tenuta di gas costante.

L'etilene prodotto all'interno di ciascun contenitore è stato prelevato (aliquote di 200 µl) e iniettato all'interno di un gascromatografo (Agilent) HP 7820A Series (Hewlett-Packard, Andover, MA, USA), dotato di colonna *Supelco* DB-1 capillare e un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). Come gas di trasporto è stato utilizzato l'idrogeno (velocità di flusso di 1 ml/min).

Il *software OpenLAB* utilizzato, ha permesso di calcolare la produzione di etilene totale, per ciascun campione, in valori TOSCA.

I valori TOSCA sono stati calcolati secondo l'equazione:

$$\text{TOSCA} = 100 - \left( \int \text{SA} / \int \text{CA} \times 100 \right)$$

dove  $\int \text{SA}$  e  $\int \text{CA}$  sono gli integrali delle aree sottese alla curva cinetica, prodotta dal *software*, ottenuta rispettivamente nella reazione dopo l'aggiunta del campione e nella reazione di controllo.

Un valore TOSCA = 0, corrisponde ad un campione senza capacità *scavenger*, cioè nessuna inibizione della formazione di etilene, rispetto alla reazione di controllo, dove  $\int \text{SA} / \int \text{CA} = 1$ , e valori maggiori di TOSCA indicano maggiore capacità *scavenger*.

Ogni esperimento è stato eseguito in tre repliche tecniche per ogni campione.

### 3.5 ANALISI TRASCRIZIONALE

#### 3.5.1 ESTRAZIONE RNA

Dai differenti campioni di tessuto, l'RNA totale è stato estratto tramite il kit di estrazione *GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit*, RTN70 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). Il kit era fornito di soluzione di lisi (contenente guanidina tiocianato), 2-mercaptoetanolo (2-ME), soluzione di lavaggio 1, soluzione di lavaggio 2 concentrata, soluzione di eluizione e tubicini da 2,0 ml, sia vuoti, che con membrane porose per filtrazione o per legame.

Seguendo il protocollo fornito dalla ditta (Figura 3.7), 40 mg di ogni singolo campione congelato, sono stati immersi in 500 µl di miscela di soluzione di lisi/2-ME, preparata in giornata (10 µl di 2-ME in 1 ml di soluzione di lisi); i campioni sono stati così lisati e sottoposti ad omogenizzazione per circa 60 secondi, mediante disaggregazione meccanica con *Ultra-Turrax® T801* (BIO-INSTRUMENTS, Firenze, Italia). Il tessuto omogenizzato è stato trasferito nei tubicini con membrana per filtrazione e centrifugato alla massima velocità (12.000-16.000 xg), al fine di ottenere, tramite la membrana di filtrazione, una prima separazione dei costituenti dell'omogenato.



Figura 3.7: Schema di estrazione dell'RNA da tessuto

Al lisato filtrato sono stati aggiunti 500 µl di soluzione di alcool etilico al 70 %, che è stato adsorbito dalla matrice di gel di silice delle membrane porose presenti nei tubicini con membrana per legame. Una volta che l'RNA si è legato alla membrana, sono stati effettuati lavaggi consecutivi con la soluzione di lavaggio 1 e la soluzione di lavaggio 2 (precedentemente diluita con alcool etilico assoluto) della membrana porosa, intervallati da brevi centrifugate (15 secondi) alla massima velocità, per permettere la rimozione di contaminanti. Infine l'RNA trattenuto sulle membrane, è stato eluito con 50 µl di soluzione di eluizione. Le procedure di purificazione sono state le stesse per tutti i campioni di partenza, salvo che per i tessuti fibrosi (tessuto muscolare scheletrico e cardiaco), a cui sono stati aggiunti 10 µl di proteinasi K a campione già omogenizzato e lasciato ad incubare per 10 minuti a 55°C per garantire l'effettiva distruzione delle cellule.

I campioni di RNA purificati, sono stati letti mediante spettrofotometro *Biowave DNA* (Biochrom WPA, Cambridge, UK) per valutare la concentrazione di RNA ottenuto e quindi conservati alla temperatura di -80°C per le analisi successive (Figura 3.8).



Figura 3.8: Spettrofotometro utilizzato. 4 µl di campione estratto sono stati caricati nella cuvetta ed è stata letta l'assorbanza a 230, 260 e 280 nm. Oltre al valore espresso in ng/µl, corrispondente alla concentrazione di RNA estratto in 1 µl di campione, lo strumento rende noti anche i rapporti A260/280 e A260/230.

Infine, mediante elettroforesi è stata valutata l'integrità e la qualità dell'RNA estratto.

### 3.5.2 q RT-PCR *Real Time*

I campioni di RNA estratto sono stati preventivamente trattati con il *Kit DNase I Amplification Grade* (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), per eliminare l'eventuale contaminazione da DNA. La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando il kit *iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit* (BIO-RAD, Milano, Italia). Ai campioni di RNA (11 µl) sono stati aggiunti i componenti del kit: 4 µl di 5x *iScript Reaction Mix*, 1 µl *iScript Reverse Transcriptase* e *Nuclease-free water* per portare a volume finale di 20 µl la soluzione. Mediante l'uso del termociclatore sono stati effettuati i seguenti passaggi:

- I. passaggio a 25°C, per 5 minuti;
- II. passaggio a 42°C, per 30 minuti;
- III. passaggio a 85°C, per 5 minuti;
- IV. passaggio a 4°C, ∞.

La PCR *Real Time* è stata eseguita con il kit *iQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* (BIO-RAD, Milano, Italy), comprendente *antibody-mediated hot-start iTaq DNA polymerase*, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR<sup>®</sup> Green I colorante, *enhancers*, stabilizzatori, fluoresceina.

I *primers* utilizzati (tabella 3.1) per la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e la β-actina, sono stati disegnati utilizzando il *software Primer Express<sup>®</sup> Software v3.0.1* (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, USA), mentre per *sirt1*, *sirt3* e per il gene codificante per NGF sono stati utilizzati *primers* riportati in letteratura (Cheung, et al., 2015; Zhang, et al., 2015).

<i>Nome del gene</i>	<i>Primer</i> <i>F: Forward</i> <i>R: Reverse</i>	<i>Numero di accesso</i>
<i>GAPDH</i>	F: 5'- GATTTGGCCGTATCGGAC-3' R: 5'-GAAGACGCCAGTAGACTC-3'	NM_021838.2
<i>β-actina</i>	F: 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3' R: 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	NM_031144.3
<i>sirt1</i>	F: 5'- CCTCCTCATTGTTATTGGGTCT -3' R: 5'- GAGGCAGAGGTTCCCTATTTATT-3'	Cheung et al., 2015
<i>sirt3</i>	F: 5'-CCCAATGTCGCTCACTACTT-3' R: 5'-AGGGATACCAGATGCTCTCT-3'	Cheung et al., 2015
<i>Gene per NGF</i>	F: 5'-CTGGGCGAGGTGAACATTAACA-3' R: 5'-CAGCCTGTTTGTCGTCTGTTGTC-3'	Zhang et al., 2015

Tabella 3.1: Elenco dei *primers* utilizzati.

Per la reazione di PCR, sono stati utilizzati: 50ng di cDNA, 300 nM di ciascun *primer*, 7,5  $\mu$ l di *Master Mix iQ SYBR Green Supermix* e 5,6  $\mu$ l di *H<sub>2</sub>O DNase-free*, per portare la miscela di reazione a 15  $\mu$ l. Nelle piastre (Quick Plate 48 wells FAM MJWhite, BIO-RAD) in Figura 3.9, sono stati caricati i campioni, nei singoli pozzetti (in triplicato) ed effettuata l'analisi tramite lo strumento *MiniOpticon Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD, Milano, Italia) e il software *Bio-Rad CFX Manager*.



Figura 3.9: *Quick Plate 48 wells FAM MJWhite*

La PCR è stata eseguita in due passaggi:

1. passaggio a 95°C, per 3 minuti (attivazione Polimerasi e denaturazione DNA);
2. 39 cicli  $\left\{ \begin{array}{l} \text{a 95°C, per 10 secondi (denaturazione);} \\ \text{a 57°C, per 30 secondi (appaiamento ed estensione);} \end{array} \right.$

per una durata complessiva di 1h e 19 minuti.

Ciascun gene *target* (*sirt1*, *sirt3*, e gene codificante per NGF, solo nell'ippocampo), di ogni singolo campione, è stato caricato insieme alla GAPDH e alla  $\beta$ -Actina, utilizzati come geni di riferimento, espressi costitutivamente (geni *house-keeping*).

La valutazione relativa dei cambiamenti nell'espressione è stata effettuata tramite il metodo del  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak & Schmittgen, 2001), normalizzando i livelli di espressione di ciascun gene *target* rispetto ai geni *house-keeping*. Questo metodo presuppone che sia i geni *target*, che i geni di riferimento, siano amplificati con un'efficienza vicina al 100%, e che la differenza delle loro efficienze non sia inferiore al 5%. L'incremento o il decremento di espressione, è stato determinato in rapporto al controllo rappresentato dai campioni ottenuti dai ratti sedentari.

I dati ottenuti in tutte le reazioni, avvenute in triplicato per ciascun campione, sono stati rappresentati nei grafici come medie  $\pm$  E.S.

### 3.6 ANALISI STATISTICA

Tutti i dati sono stati espressi come medie  $\pm$  E.S.

Dal momento che i dati sono risultati distribuiti normalmente secondo il metodo di Kolmogorov-Smirnov, le comparazioni entro i gruppi sono state eseguite con i test parametrici ANOVA per misure ripetute e Bonferroni post-hoc test.

L'analisi statistica dei dati ottenuti con il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , e con la metodica TOSCA è stata eseguita tramite il *test t* di Student per dati non appaiati.

La significatività statistica è stata fissata a  $p < 0,05$ . L'analisi è stata condotta con il *software* Prism 4.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

## 4. RISULTATI

### 4.1 ALLENAMENTO

Il programma di allenamento descritto in Materiali e Metodi (vedi par. 3.2) è stato eseguito dopo una settimana di adattamento, che è servito a far familiarizzare gli animali con l'apparato di allenamento. Durante l'adattamento gli animali sono stati lasciati liberi di esplorare la ruota nei primi due giorni, dopo di che nei 3 giorni successivi la ruota è stata azionata ad una velocità di 4 – 5 m/min, consentendo così ai ratti di imparare a coordinare la propria andatura con il movimento rotatorio dell'apparato. Al termine dell'adattamento (sessione 0 in Figura 4.1) i 5 animali sperimentali sono arrivati a percorrere in media 134,49 m, adattandosi a camminare di continuo per 30 minuti. In generale, gli animali hanno scelto di camminare seguendo il senso antiorario della ruota.

Sono seguite le 18 sessioni di allenamento, 3 a settimana, a giorni alterni, per 6 settimane.

Ogni sessione di allenamento aveva una durata complessiva di 30 minuti e la velocità di rotazione della ruota veniva incrementata di 1m/min, ogni 15 minuti, partendo, nelle sessioni successive, dalla velocità finale raggiunta nella precedente (Figura 3.4). In tal modo, aumentando la velocità sessione dopo sessione, i ratti hanno percorso progressivamente distanze maggiori. Per ogni sessione, seguendo la preferenza mostrata dagli animali durante l'adattamento, è stato selezionato dall'operatore il movimento antiorario della ruota.

Nella sessione 1, i ratti hanno percorso mediamente 215,75 m, partendo da una velocità iniziale di 5 m/min, incrementata a 6 m/min negli ultimi 15 minuti, aumentando in modo significativo rispetto al periodo di adattamento la distanza percorsa (ANOVA per misure ripetute,  $F_{(18,94)} = 1125$ ,  $p < 0,0001$ ; *Bonferroni post hoc Test*,  $p < 0,01$ ).

Nella sessione 2, la velocità di partenza è stata di 6 m/min, incrementata a 7m/min; così, via via la velocità è stata incrementata fino a 20 m/min, alla fine della sessione 15, dove i ratti hanno percorso mediamente 452,65 m.

Provando ad incrementare ulteriormente la velocità, oltre i 20 m/min, l'animale sembrava mostrare segni di affaticamento; per questo motivo si è scelto di mantenere l'incremento raggiunto nella sessione 15 (da 19 m/min a 20 m/min), anche nelle ultime tre sessioni di allenamento. Alla fine della VI settimana, gli



animali sono riusciti a percorrere in media 537,20 m (Figura 4.1), ottenendo un incremento di distanza percorsa significativamente maggiore ad ogni successiva sessione tranne che per le sessioni 6, 8, 11, 12, 14 e 15.

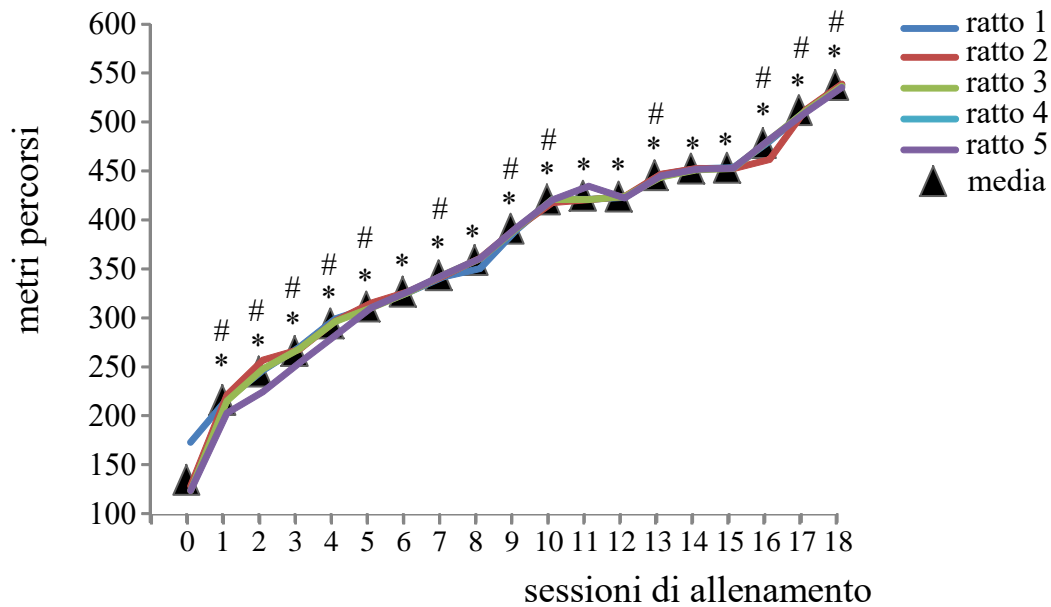


Figura 4.1: Andamento delle 18 sessioni di allenamento: sono riportati i metri percorsi alla fine di ogni singola sessione, per ciascun ratto (linee colorate) e la media delle distanze percorse dai 5 ratti allenati(▲) in ogni sessione. \* indica  $p < 0,01$  rispetto alla sessione 0; # indica  $p < 0,05$  tra sessioni.

## 4.2 ESPRESSIONE GENICA DI sirt1 E sirt3 NEI DIVERSI TESSUTI

Dal momento che le sirtuine sono coinvolte in importanti processi metabolici cellulari, è stata eseguita la valutazione dell'espressione genica di sirt1 e sirt3 in campioni di tessuti metabolicamente attivi quali il tessuto muscolare scheletrico (muscolo gastrocnemio), il tessuto cardiaco e il tessuto epatico prelevati dai 5 ratti allenati e dai 3 ratti sedentari, allo scopo di valutare variazioni di espressione indotte dall'esercizio fisico.

L'analisi è stata condotta con qRT-PCR *Real Time*. I livelli dei trascritti di ciascun gene *target* sono stati normalizzati ai livelli di espressione di GAPDH e  $\beta$ -actina presi come geni *house-keeping* e comparati con i livelli di espressione dei geni *target* nei campioni di tessuto prelevati dai ratti sedentari.

Nel tessuto muscolare scheletrico l'analisi statistica non ha mostrato differenze significative tra ratti allenati e ratti sedentari sia per sirt1 (allenati:  $0,0774 \pm 0,120$ ; sedentari:  $1,000 \pm 0,116$ ; t test, df = 12; t = 1,046; p = 0,316), che per sirt3 (allenati:  $0,873 \pm 0,116$ ; sedentari:  $1,000 \pm 0,139$ ; t test, df = 22; t = 0,688; p = 0,4987) (Figura 4.2).

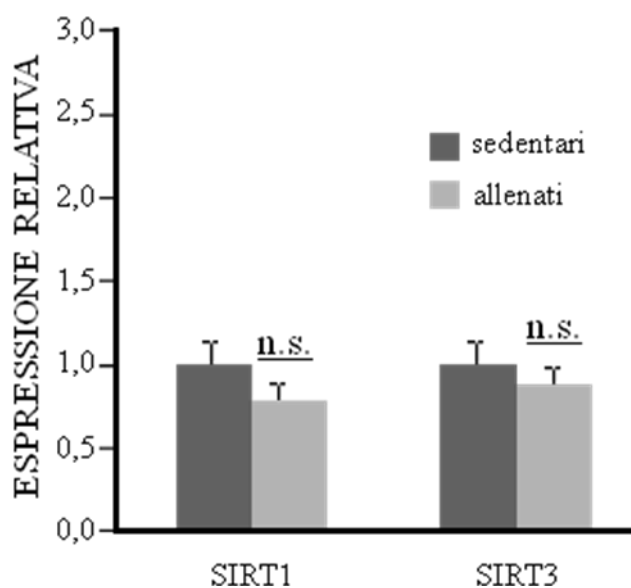


Figura 4.2: Livelli di espressione di sirt1 e sirt3 nel muscolo gastrocnemio. Si noti come l'espressione dei geni codificanti per entrambe le sirtuine non è significativamente differente nei ratti allenati rispetto ai ratti sedentari. n.s. indica p > 0,05.

Anche nel fegato, i dati ottenuti non hanno mostrato significative differenze di espressione tra ratti allenati e ratti sedentari, sia per sirt1 (allenati:  $1,255 \pm 0,188$ ; sedentari:  $1,000 \pm 0,011$ ; t test, df = 28; t = 0,878; p = 0,387) che per sirt3 (allenati:  $1,004 \pm 0,113$ ; sedentari:  $1,000 \pm 0,098$ ; t test, df = 28; t = 0,0215; p = 0,982) (Figura 4.3).

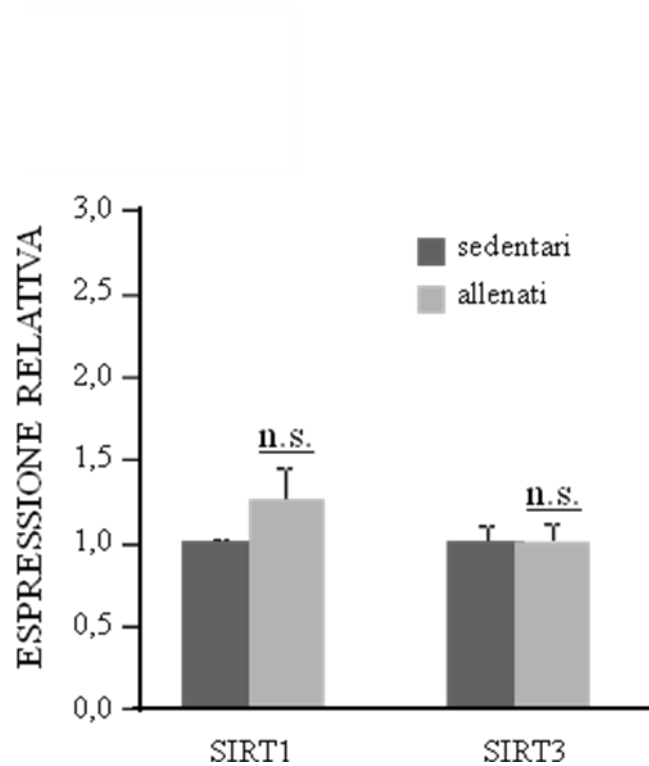


Figura 4.3: Livelli di espressione di sirt1 e sirt3 nel fegato. Si noti come l'espressione dei geni codificanti per entrambe le sirtuine non è significativamente diversa nei ratti allenati rispetto ai ratti sedentari. n.s. indica  $p > 0,05$ .

Nel tessuto cardiaco, invece, il gene sirt1 è risultato espresso in modo significativamente maggiore nei ratti allenati rispetto ai sedentari (allenati:  $1,969 \pm 0,211$ ; sedentari:  $1,000 \pm 0,046$ ; t test, df = 9; t = 4,915; p = 0,0008). Per quanto riguarda il gene sirt3, non si sono evidenziate differenze significative (allenati:  $1,184 \pm 0,269$ ; sedentari:  $1,000 \pm 0,09$ ; t test, df = 9; t = 0,692; p = 0,506) (Figura 4.4).

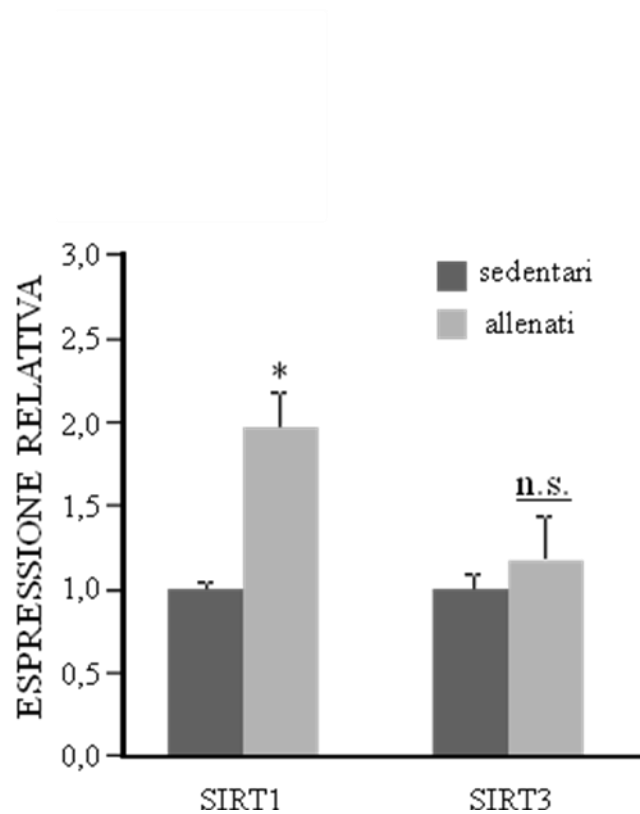


Figura 4.4: Livelli di espressione di sirt1 e sirt3 nel cuore. Si noti come l'espressione del gene sirt1 è significativamente maggiore nei ratti allenati, rispetto ai ratti sedentari. I livelli di espressione del gene sirt3, invece non differiscono significativamente nei due gruppi di ratti. \* indica  $p < 0,05$ , **n.s.** indica  $p > 0,05$ .

### 4.3 ESPRESSIONE GENICA DI *sirt1*, *sirt3* E DEL GENE CODIFICANTE PER NGF NELL'IPPOCAMPO

Dal momento che dati presenti in letteratura (vedi per esempio: Neeper et al., 1996; Hong, et al., 2015) suggeriscono che l'esercizio fisico aumenta i livelli trascrizionali delle neurotrofine, soprattutto nell'ippocampo, nel nostro studio siamo andati a misurare i livelli di espressione del gene che codifica per NGF oltre che delle sirtuine, in porzioni di ippocampo prelevate dai ratti allenati e dai ratti sedentari.

Come mostra la Figura 4.5, nei ratti allenati c'è una tendenza ad un incremento dell'espressione di tutti e tre i geni considerati, *sirt1* (allenati:  $1,392 \pm 0,250$ ; sedentari:  $1,000 \pm 0,154$ ; t test, df = 37; t = 0,812; p=0,422), *sirt3* (allenati:  $1,830 \pm 0,217$ ; sedentari:  $1,000 \pm 0,123$ ; t test, df = 43; t = 1,879; p = 0,067) e gene codificante per NGF (allenati:  $1,912 \pm 0,243$ ; sedentari:  $1,000 \pm 0,129$ ; t test, df=31; t=2,235; p=0,032), anche se la significatività statistica è stata ottenuta solo per il gene che codifica per NGF, la cui espressione è risultata fortemente incrementata.

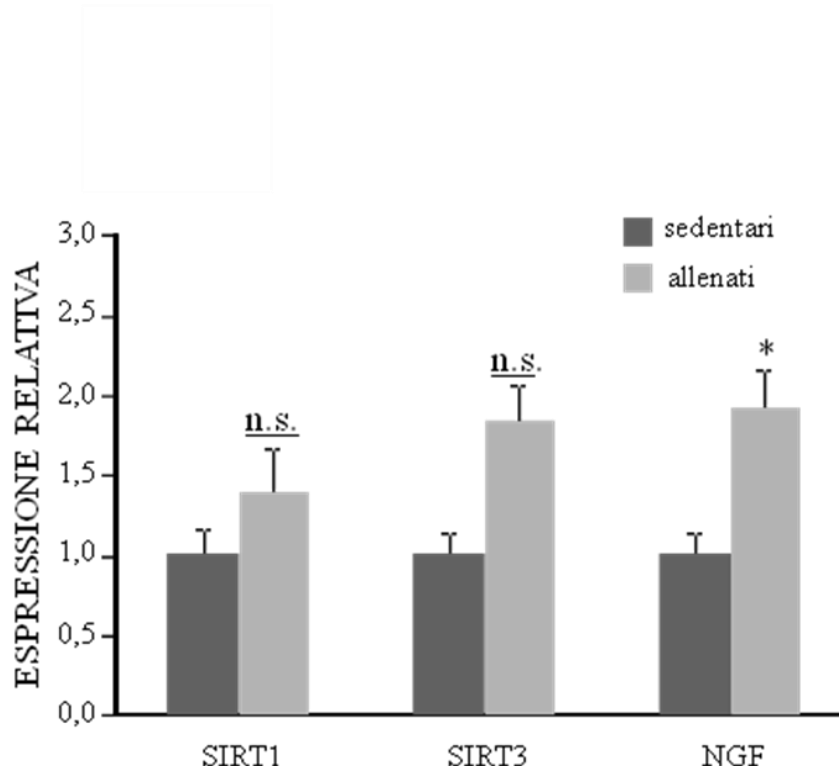


Figura 4.5: Livelli di espressione di *sirt1*, *sirt3* e gene codificante per NGF nell'ippocampo. Si noti come l'espressione del gene che codifica per NGF è significativamente maggiore nei ratti allenati, rispetto ai ratti sedentari. \* indica  $p < 0,05$ , **n.s.** indica  $p > 0,05$ .

#### 4.4 ANALISI TOSCA

Studi condotti sulle sirtuine (Merksamer et al., 2013), hanno dimostrato come, alcune molecole *target* dell'attività deacetilasica di queste proteine, siano coinvolte nella modulazione dei principali enzimi antiossidanti. Questa stretta correlazione tra sirtuine e riduzione dello stress ossidativo, ci ha indotti ad analizzare anche i livelli di capacità antiossidante mediante analisi TOSCA.

L'analisi gascromatografica TOSCA è stata effettuata sui campioni di tessuto cerebrale, per andare a valutare la capacità *scavenger* a livello ippocampale, nei ratti allenati vs i ratti sedentari sia nei confronti di alcuni ROS (perossilici ed idrossilici) sia nei confronti dei derivati del perossinitrito che insieme all'ossido nitrico (NO) appartiene alle specie reattive dell'azoto (RNS).

I ratti allenati hanno mostrato un'attività antiossidante superiore per tutte e 3 le specie radicaliche considerate: il test t per dati non appaiati ha evidenziato i seguenti risultati: per i radicali perossilici ROO· nei ratti allenati TOSCA =  $1,567 \pm 0,085$  e nei sedentari  $1,138 \pm 0,037$ , ( $p = 0,0011$ ,  $t = 3,754$ ,  $df = 22$ ); per i radicali idrossilici OH nei ratti allenati TOSCA =  $2,114 \pm 0,053$  e nei sedentari  $1,936 \pm 0,05$ , ( $p = 0,0367$ ,  $t = 2,225$ ,  $df = 22$ ); per i derivati del perossinitrito (ONOO·) nei ratti allenati TOSCA =  $1,99 \pm 0,048$  e nei sedentari  $1,65 \pm 0,046$  ( $p < 0,0001$ ,  $t = 4,742$ ,  $df = 22$ ).

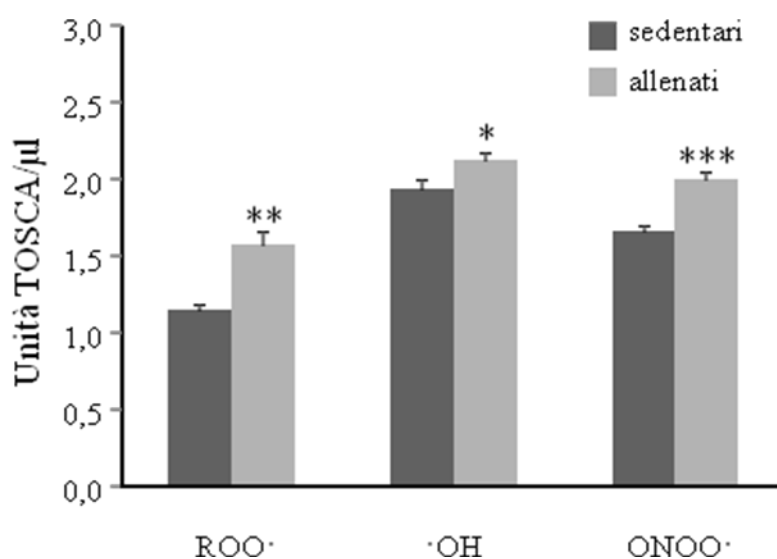


Figura 4.6 Indici TOSCA (Unità/μl) per i radicali perossili (ROO·), idrossilici (·OH) e derivati del perossinitrito (ONOO·), riscontrati nell'ippocampo dei ratti allenati e dei ratti sedentari. \* indica  $p < 0,05$ , \*\* indicano  $p < 0,01$ , \*\*\* indicano  $p < 0,0001$ .

## 5. DISCUSSIONE

Questo lavoro è stato condotto su ratti di età medio-adulta, già soggetti a processi di invecchiamento cellulare, con l'obiettivo di valutare differenze significative nell'espressione dei geni codificanti per le sirtuine, in campioni di tessuto muscolare, cardiaco, epatico e nervoso, isolati sia da ratti sottoposti ad attività fisica, sia da ratti non allenati, e valutare, a livello ippocampale, l'espressione del gene codificante per la neurotrofina NGF e l'attività antiossidante in entrambi i gruppi di animali studiati.

I risultati ottenuti mostrano chiaramente come l'attività fisica a cui sono stati sottoposti i 5 ratti sperimentali, abbia indotto un aumento significativo dell'espressione del gene codificante per sirtuina 1 a livello cardiaco, e del gene codificante per la neurotrofina NGF a livello ippocampale, dove è stata anche analizzata direttamente l'attività antiossidante, risultando significativamente maggiore nei ratti allenati a confronto con i ratti sedentari.

Il legame meccanicistico tra esercizio fisico e invecchiamento è stato sconosciuto fino agli anni 50. Nel 1956, Harman ipotizzò che la causa della senescenza cellulare fosse lo stress ossidativo, dimostrando come il danneggiamento progressivo a cui va incontro naturalmente l'organismo con il trascorrere del tempo, sia caratterizzato da un lento spegnimento dei sistemi *scavenger* delle cellule, determinando un accumulo progressivo dei radicali liberi; l'aumento di concentrazione dei radicali liberi altera funzionalmente e strutturalmente le cellule, portandole all'apoptosi e conducendo ai processi di senescenza naturale. Pertanto, i processi di senescenza naturale e di stress ossidativo risultano causa ed effetto gli uni degli altri. Questo "circolo vizioso" si traduce in varie alterazioni strutturali e funzionali degli organi quali ipertrofia tissutale, ispessimento delle membrane, fibrosi connettivale, perdita di resistenza, elasticità, massa e volume, che progredendo possono portare alla manifestazione di diverse patologie molto comuni nell'anziano sia cardiovascolari che croniche (Berlin & Colditz, 1990).

Diversi studi (per una revisione vedi Finkel & Holbrook, 2000) hanno dimostrato come i processi infiammatori che caratterizzano le patologie correlate all'invecchiamento, aumentino i livelli di ROS: il reclutamento di cellule infiammatorie, neutrofili, macrofagi, microglia e cellule vascolari, contribuiscono

all'aumento dello stress ossidativo, mediante l'attività del potente sistema NADPH-ossidasi, per incrementata produzione di superossido; il superossido, insieme a NO endogeno, a livello vasale e cerebrale, genera perossinitrito e altre specie radicaliche, incidendo sulla progressione della patogenesi dei disturbi senili.

La farmacopea a riguardo, ha inizialmente previsto la somministrazione di molecole antiossidanti in pazienti affetti da patologie correlate alla senescenza naturale, al fine di limitare l'accumulo di specie radicaliche; queste somministrazioni, però, non sembrano mostrare gli effetti benefici previsti (Seddon et al., 1994; Stephens et al., 1996). Ciò che invece sembra incidere positivamente sulla riduzione dei livelli di stress ossidativo in soggetti adulti è la semplice attività fisica.

Da un punto di vista fisiologico, l'esercizio fisico può essere inteso come fattore stressogeno per l'organismo: l'incremento del metabolismo aerobico e della respirazione mitocondriale che avvengono durante l'esecuzione di attività fisica, determina un aumento dei livelli di ROS, inducendo stress ossidativo; ma, come accennato precedentemente, l'attività fisica a livelli moderati e costanti nel tempo, induce una risposta adattativa nei confronti dello stress ossidativo, aumentando le capacità antiossidanti delle cellule (Ristow & Zarse, 2010).

In letteratura, è stato già dimostrato (Falone et al., 2012), mediante lo studio dei biomarcatori per la valutazione della perossidazione lipidica, come, a livello ippocampale, il danno perossidativo dovuto all'invecchiamento, diminuisca fortemente a seguito di un programma di allenamento.

Nel nostro studio, è stata condotta un'analisi diretta dell'attività antiossidante, su campioni di ippocampo, prelevati da ratti sottoposti ad un programma di allenamento moderato e costante, della durata di 6 settimane, 3 volte a settimana.

La tecnica da noi utilizzata (TOSCA), consente di valutare separatamente la capacità antiossidante nei confronti delle differenti specie radicaliche. I dati ottenuti hanno evidenziato un incremento significativo dell'attività delle molecole *scavenger*, nei confronti dei radicali perossilici, idrossilici e derivati del perossinitrito, nei ratti allenati rispetto a ratti sedentari.

Di particolare interesse è l'incremento dell'attività antiossidante nei confronti dei radicali idrossilici, osservato nei ratti allenati. I radicali idrossilici rappresentano la forma radicalica più tossica e reattiva tra le specie, e l'organismo li può



contrastare solo parzialmente, mediante la produzione limitata di glutazione perossidasi, che converte gli idrossilici in H<sub>2</sub>O. Inoltre, la pratica clinica evidenzia che gli antiossidanti disponibili in commercio hanno scarsa efficacia nei confronti di questa specie radicalica; pertanto assume particolare importanza il fatto che un'attività fisica moderata e costante, sviluppi una buona attività antiossidante proprio nei confronti dei radicali idrossilici.

Focalizzando l'attenzione sui meccanismi endogeni che consentono all'attività fisica di ridurre lo stress ossidativo, il nostro studio ha preso in esame il ruolo delle sirtuine. Come descritto nell'introduzione, le SIRTs sono proteine deacetilasiche, sensibili a variazioni dei livelli di NAD<sup>+</sup> disponibile e dei suoi intermedi. L'esercizio fisico incrementa l'attività delle sirtuine e di conseguenza viene incrementata l'attività dei sistemi *scavenger* della cellula (SOD2, catalasi, glutazione perossidasi, MnSOD). Al contrario l'invecchiamento cellulare riduce l'attività delle SIRTs (Chang & Guarente, 2014). Ciò che invece rimane ancora da chiarire è se la maggiore attivazione delle sirtuine dipenda da un incremento della loro espressione genica e/o proteica, o da un aumento della loro attività deacetilasica. In questo lavoro abbiamo cominciato a mettere a confronto l'espressione genica di sirt1 e sirt3, in vari tessuti isolati da ratti sottoposti ad attività fisica moderata e costante e da ratti sedentari. La scelta di analizzare queste due sirtuine si è basata su innumerevoli studi già presenti in letteratura nei quali è descritta la loro localizzazione cellulare, la loro ubiquitarietà, i processi che le vedono coinvolte, i livelli di attività deacetilasica, ma mai un'eventuale modulazione della loro espressione genica.

Inoltre all'attività deacetilasica di SIRT1 e di SIRT3 è legata l'attività del coattivatore trascrizionale di recettori nucleari PGC1 $\alpha$ : infatti, PGC1 $\alpha$  è una molecola *target* dell'attività di SIRT1 e a sua volta controlla la trascrizione del gene sirt3 (Kincaid et al., 2013) (vedi Figura 1.7). In questo meccanismo a cascata che interessa SIRT1, PGC1 $\alpha$  e SIRT3, si inserirebbe l'esercizio fisico come elemento che amplifica l'efficienza dei fattori coinvolti.

I risultati ottenuti in questo lavoro a livello del tessuto muscolare scheletrico, non mostrano variazioni significative di espressione dei geni che codificano per entrambe le sirtuine nei ratti allenati, rispetto ai sedentari. Questi dati sono in accordo con quanto osservato da Kolkai et al. (2010), i quali hanno allenato, su *tapis roulant*, ratti maschi Wistar, medio-adulti (3 mesi, come i ratti utilizzati nel

nostro studio) e ratti anziani (26 mesi), per 6 settimane; come nel nostro caso, gli autori hanno osservato che nei ratti adulti allenati, non c'è stato un significativo aumento di espressione del gene codificante per SIRT1, rispetto a ratti sedentari di pari età, ma un aumento dell'attività deacetilasica, per aumento dei livelli di molecole di  $\text{NAD}^+$  disponibili. Nei ratti anziani allenati, invece, c'è stato un aumento di espressione del gene *sirt1*, che gli autori hanno spiegato come probabile risposta adattativa ad una carenza di attività della sirtuina, causata da ridotta disponibilità di molecole di  $\text{NAD}^+$ , tipica della condizione di invecchiamento.

Anche a livello epatico, i risultati da noi ottenuti non mostrano un incremento significativo di espressione, né del gene *sirt1*, né del gene *sirt3*. Fin ad oggi, gli studi condotti a questo proposito mostrano possibili alterazioni a carico dell'espressione genica di entrambi i geni, solo in condizioni di restrizione calorica; in particolare una carenza non eccessiva di nutrienti, può determinare sia un incremento dell'attività indotta delle sirtuine, sia un aumento dei loro livelli trascrizionali (Nogueiras et al., 2012).

Un dato interessante ottenuto nel nostro studio, è l'incremento significativo di espressione del gene *sirt1* nel cuore dei ratti allenati, che è risultato espresso 2 volte di più rispetto ai sedentari. Questo risultato, in accordo con quanto osservato da Corbi et al. (2012) e Lai et al. (2014), evidenzia come l'esercizio fisico moderato aumenti, in modo non eccessivo, l'espressione di *sirt1*, producendo probabilmente un miglioramento dell'attività antiossidante nel cuore e rallentandone i processi di invecchiamento, caratterizzati da aspetti biochimici e istologici peculiari quali: ipertrofia dell'atrio sinistro, ispessimento della membrana del ventricolo sinistro, alterazione di proteine contrattili e regolatrici, riduzione del numero di miociti, fibrosi dei nodi e del tessuto connettivale e alterazioni nella generazione e conduzione dell'impulso nervoso. Di contro, un'eccessiva sovra-espressione di *sirt1* (> 12,5 volte) può rendere SIRT1 non più una proteina protettiva, ma riducendo l'attività di  $\text{PGC1}\alpha$ , può portare ad insufficienza cardiaca, cardiomiopatia ipertrofica, deplezione di ATP, ridotta espressione di citrato sintasi, disfunzione mitocondriale e maggiore stress ossidativo, come dimostrato da Alcendor et al. (2007) in topi transgenici.

A livello ippocampale, l'analisi dell'espressione genica non ha mostrato differenze significative tra i due gruppi di animali studiati, per quanto riguarda i

geni sirt1 e sirt3, mentre ha evidenziato un aumento significativo dell'espressione del gene codificante per NGF nei ratti allenati, rispetto ai ratti non sottoposti ad attività fisica. Questo dato, in accordo con lavori simili nei quali sono stati valutati i livelli di espressione di BDNF (Radak et al., 2006), contribuisce a dimostrare da un punto di vista biologico-molecolare l'osservazione ormai consolidata che l'attività fisica produce benefici, soprattutto a livello ippocampale, in soggetti anziani dove la perdita progressiva dei neuroni e la demielinizzazione comportano una riduzione del volume cerebrale, con compromissione delle funzioni cognitive (Terry et al., 2011). Inoltre un ruolo importante di NGF e del suo recettore trkA, nel ridurre la formazione di radicali liberi tossici (perossilici) attraverso l'alterazione di vie di segnalazione mitogeni-attivate era già stata osservata da Dugan et al. nel 1997, in neuroni del ganglio cervicale superiore e in linee cellulari del sistema nervoso centrale, e ciò può spiegare l'incremento di attività antiossidante che abbiamo riscontrato a livello ippocampale nei ratti da noi allenati.

## 6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

L'ipotesi che l'esercizio fisico rappresenti il linea generale un fattore di protezione per l'intero organismo, oggi non è più un'ipotesi. Le evidenze scientifiche hanno ormai chiarito che un'attività fisica, non eccessiva, ma moderata e soprattutto costante nel tempo, migliorare la qualità della vita, inducendo benefici energetici, biochimici e fisiologici, nell'intero organismo.

Questo lavoro di tesi ha confermato come in un modello animale adulto, un allenamento di intensità moderata e costante nel tempo apporti benefici sia a livello cardiaco, per l'incremento significativo dell'espressione genica di sirt1, che a livello ippocampale, dove è incrementata l'espressione del gene codificante per NGF e l'attività antiossidante specifica nei confronti delle tre specie radicaliche perossiliche, idrossiliche e derivati del perossinitrito. Sulla base di questi risultati possiamo concludere e confermare che in soggetti anziani, un allenamento moderato e costante combatte gli effetti dell'invecchiamento e ne ritarda i sintomi, bloccando la progressione dei danni derivati dallo stress ossidativo, che si accumula anno dopo anno, per carenza di difese antiossidanti.

Le analisi condotte e i risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano come l'utilizzo di un modello animale permetta di valutare i fenomeni correlati all'esercizio fisico, rendendo così possibile il trasferimento delle informazioni ottenute all'uomo.

Ci si propone in futuro di completare l'analisi TOSCA per valutare l'attività antiossidante anche negli altri tessuti estratti, con particolare interesse al tessuto cardiaco, sulla base del dato ottenuto sull'espressione genica di sirt1; di effettuare mediante tecniche di immunorivelazione la ricerca delle proteine SIRT1, SIRT3 e NGF, e di esse analizzarne anche l'attività enzimatica, sui campioni utilizzati.

Uno degli obiettivi primari delle istituzioni sanitarie risulta essere la promozione dell'attività fisica come terapia contro i danni provocati dall'invecchiamento, da "somministrare" a soggetti over 60 anni. E' bene però sottolineare che l'esercizio fisico può avere una valenza non trascurabile, se praticato a scopo preventivo, in soggetti adulti, per posticipare la manifestazione dei fenomeni di senescenza, a cui va incontro naturalmente l'organismo.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Abe, J., & BC., B. (1998). Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* , 8 (2), 59-64.
2. AlbertsB., B. D. (2009). *Biologia Molecolare della Cellula*. Zanichelli.
3. Alcendor RR1, G. S. (2007). Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res.* , 100 (10), 1512-21.
4. American College of Sports Medicine, C.-Z. W. (2009). American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc.* , 41 (7), 1510-30.
5. Barthel A1, S. D. (2005). FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* , 16 (4), 183-9.
6. Bayod S1, D. V.-R. (2011). Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol (1985).* , 111 (5), 1380-90.
7. Benoit, H., Jordan, M., Wagner, H., & Wagner, P. (1999). Effect of NO, vasodilator prostaglandins, and adenosine on skeletal muscle angiogenic growth factor gene expression. *J Appl Physiol (1985).* , 5 (86), 1513-8.
8. Ben-Porath, I., & Weinberg, R. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* , 37 (5), 961-76.
9. Berlin, J., & Colditz, G. (1990). A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol.* , 132 (4), 612-28.
10. Bishop NA1, L. T. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature.* , 464 (7288), 529-35.
11. Blander, G., & Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem.* , 73, 417-35.
12. Bordone L1, M. M. (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* , 4 (2), e31.
13. Braidy N1, P. A.-L. (2015). Differential expression of sirtuins in the aging rat brain. *Front Cell Neurosci.* , 9 (167).
14. Chabi B1, A. P. (2009). Relationship between Sirt1 expression and mitochondrial proteins during conditions of chronic muscle use and disuse. *107 (6)*, 1730-5.

15. Chang, H., & Guarente, L. (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* , 25 (3), 138-45.
16. Cheung, K.G., Cole, L.K., Xiang, B., Chen, K. (2015). Sirtuin-3 (SIRT3) Protein Attenuates Doxorubicin-induced Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Respiration in H9c2 Cardiomyocytes. *J Biol Chem.*, 290(17), 10981-93.
17. Colcombe, S., Kramer, A., McAuley, E., Erickson, K., & Scalf, P. (2004). Neurocognitive aging and cardiovascular fitness: recent findings and future directions. *J Mol Neurosci.* , 24 (1), 9-14.
18. Conti, F. (2010). *Fisiologia medica*. Milano: Edi.Ermes.
19. Corbi G1, C. V. (2012). Is physical activity able to modify oxidative damage in cardiovascular aging? *Oxid Med Cell Longev.* , 2012 (728547), 1-6.
20. Denu, J. (2005). The Sir2 family protein deacetylases. . *Curr Opin Chem Biol.* , 9 (5), 431-40.
21. Dietrich MO1, A. C. (2010). Agrp neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity. *J Neurosci.* , 30 (35), 11815-25.
22. Dishman RK1, B. H.-P.-N. (2006). Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring).* , 14 (3), 345-56.
23. Dugan LL1, C. D. (1997). Rapid suppression of free radical formation by nerve growth factor involves the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 94 (8), 4086-91.
24. Falone S1, D. A. (2012). Late-onset running biphasically improves redox balance, energy- and methylglyoxal-related status, as well as SIRT1 expression in mouse hippocampus. *PLoS One* , 7 (10).
25. Finkel, T., & Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* , 408 (6809), 239-47.
26. Fiorino E1, G. M. (2014). The sirtuin class of histone deacetylases: regulation and roles in lipid metabolism. *IUBMB Life.* , 66 (2), 89-99.
27. Flachsbar F1, C. P. (2006). Sirtuin 1 (SIRT1) sequence variation is not associated with exceptional human longevity. *Exp Gerontol.* , 41 (1), 98-102.
28. Franzoni, F., Galletta, F., MorizzoC, Lubrano, V., Palombo, C., & Santoro, G. (2004). Effects of age and physical fitness on microcirculatory function. *Clin Sci (Lond).* , 106 (3), 329-35.

29. Furukawa A1, T.-O. S. (2007). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD<sup>+</sup> depletion. *Cell Physiol Biochem.* , 20 (1-4), 45-54.
30. Golden TR1, H. D. (2002). Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell.* , 1 (2), 117-23.
31. Goodpaster BH, B. N. (2005). Skeletal muscle lipid and its association with insulin resistance: what is the role for exercise? . *Exerc Sport Sci Rev.* , 33, 150–154.
32. Harman. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* , 11 (3), 298-300.
33. Herzig S1, L. F. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* , 413 (6852), 179-83.
34. Hong, Y., Lee, H., & Kim, H. (2015). Treadmill exercise after social isolation increases the levels of NGF, BDNF, and synapsin I to induce survival of neurons in the hippocampus, and improves depression-like behavior. *J Exerc Nutrition Biochem.* , 19 (1), 11-8.
35. Hood DA1, I. I. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol.* , 209 (12), 2265-75.
36. Imai S1, A. C. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* , 403 (6771), 795-800.
37. Jacobs KM1, P. J.-B. (2008). SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci.* , 4 (5), 291-9.
38. Jen CJ1, C. H. (2002). Chronic exercise improves endothelial calcium signaling and vasodilatation in hypercholesterolemic rabbit femoral artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* , 22 (7), 1219-24.
39. Jin L1, G. H. (2009). Biochemical characterization, localization, and tissue distribution of the longer form of mouse SIRT3. *Protein Sci* , 18 (3), 514-25.
40. Jing E1, E. B. (2011). Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 108 (35), 14608-13.
41. Kim HS1, P. K.-J.-B. (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell.* , 17 (1), 41-52.

42. Kincaid B1, B.-W. E. (2013). Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* , 5 (48).
43. Kokkinos P1, M. J. (2010). Exercise and physical activity: clinical outcomes and applications. *Circulation.* , 122 (16), 1637-48.
44. Koltai E1, S. Z. (2010). Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech Ageing Dev.* , 131 (1), 21-8.
45. Kolthur-Seetharam U1, D. F.-C. (2006). Control of AIF-mediated cell death by the functional interplay of SIRT1 and PARP-1 in response to DNA damage. *Cell Cycle.* , 5 (8), 873-7.
46. Kong X1, W. R. (2010). Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One.* , 5 (7).
47. Kraus WE1, H. J. (2002). Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* , 347 (19), 1483-1492.
48. Kucińska M, P. H. (2010). Sirtuins--modulation of their activity as a novel therapeutic target. *Pol Merkur Lekarski.* 28, 231-5.
49. Lai CH1, H. T. (2014). Exercise training enhanced SIRT1 longevity signaling replaces the IGF1 survival pathway to attenuate aging-induced rat heart apoptosis. *Age (Dordr).* , 36 (5), 9706.
50. Lan F1, C. J. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* , 283 (41), 27628-35.
51. Lanza IR1, S. D. (2008). Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes.* , 57 (11), 2933-42.
52. Lebovitz RM1, Z. H. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 93 (18), 9782-7.
53. Li X1, Z. S. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell.* , 28 (1), 91-106.
54. Liu YF1, C. H. (2009). Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol.* , 587 (13), 3221-31.
55. Luo J1, N. A. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell.* , 107 (2), 137-48.



56. MacDougall J.D., e. a. (1977). Biochemical adaptation of human skeletal muscle to heavy resistance training and immobilization. (43), 700.
57. McArdle, W. D., Katch, F. I., & Katch, V. L. (2009). *Fisiologia applicata allo sport, aspetti energetici, nutrizionale e performance*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana.
58. Merati, G. (2002). Quanto esercizio fare per star bene. *Rr-Ricerca Roche* .
59. Merksamer PI1, L. Y. (2013). The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging (Albany NY)* , 5 (3), 144-50.
60. Michan, S., & Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* , 130 (404), 1-13.
61. Motoyama M1, S. Y. (1998). Blood pressure lowering effect of low intensity aerobic training in elderly hypertensive patients. *Med Sci Sports Exerc.* , 30 (6), 818-23.
62. Neeper SA1, G.-P. F. (1996). Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* , 726 (1-2), 49-56.
63. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2006). *I principi di biochimica di Lehninger*. Bologna: Zanichelli.
64. Noble EG1, M. A. (1999). Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. *J Appl Physiol* (1985). , 86 (5), 1696-701.
65. Nogueiras R1, H. K. (2012). Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev.* , 92 (3), 1479-514.
66. North, B., & Verdin, E. (2004). Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* , 5 (5), 224.
67. Palacios OM1, C. J. (2009). Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)* . , 15 (1), 771-83.
68. Paoli, A., Neri, M., & Bianco, A. (2013). *Principi di metodologia del fitness*. Erika Editrice.
69. Pfluger PT1, H. D.-M. (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 105 (28), 9793-8.
70. Philp A1, C. A. (2011). Sirtuin 1 (SIRT1) deacetylase activity is not required for mitochondrial biogenesis or peroxisome proliferator-activated

- receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation following endurance exercise. *286* (35), 30561-70.
71. Picard F1, K. M.-N. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature.* , *429* (6993), 771-6.
  72. Pillai VB1, S. N. (2010). Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J Biol Chem.* , *285* (5), 3133-44.
  73. Radak Z1, T. A. (2006). The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int.* , *49* (4), 387-92.
  74. Ramadori G1, L. C. (2008). Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. *J Neurosci.* , *28* (40), 9989-96.
  75. Rathaus M1, L. B. (2009). DeubiKuitylation: a novel DUB enzymatic activity for the DNA repair protein, Ku70. *Cell Cycle.* , *8* (12), 1843-52.
  76. Regoli F1 & Winston GW. (1999). Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol Appl Pharmacol*, *156* (2), 96-105.
  77. Ristow M and Zarse K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol.*; *45*, 410-418.
  78. Sauve AA, W. C. (2006). The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem.* , 435–465.
  79. Schwer B1, N. B. (2002). The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* , *158* (4), 647-57.
  80. Seddon JM1, C. W. (1994). The use of vitamin supplements and the risk of cataract among US male physicians. *Am J Public Health.* , *84* (5), 788-92.
  81. Shigenaga MK1, H. T. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , *91* (23), 10771-8.
  82. Someya S1, Y. W. (2010). Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell.* , *143* (5), 802-12.
  83. Stephens NG1, P. A. (1996). Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.* , *343* (9004), 781-6.

84. Sun C1, Z. F. (2007). SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab.* , 6 (4), 307-19.
85. Sundaresan NR1, G. M. (2009). Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest.* , 119 (9), 2758-71.
86. Terry AV Jr1, K. A. (2011). Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol Behav.* , 102 (2), 149-57.
87. Van Loon LJ, G. B. (2006). Increased intramuscular lipid storage in the insulinresistant and endurance-trained state. . *Pflugers Arch.* , 451, 606–616.
88. Vogt PK1, J. H. (2005). Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle.* , 4 (7), 908-13.
89. Wang C1, C. L. (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol.* , 8 (9), 1025-31.
90. Wątroba, M., & Szukiewicz, D. (2015). The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci.* , 61 (1), 52-62.
91. Westerheide SD1, A. J. (2009). Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science.* , 323 (5917), 1063-6.
92. Yamakuchi M1, L. C. (2009). MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle.* , 8 (5), 712-5.
93. Zhang L., Fang Y., Lian Y., Chen Y. (2015). Brain-derived neurotrophic factor ameliorates learning deficits in a rat model of Alzheimer's disease induced by  $\text{A}\beta$ 1-42. *PLoS One*, 10 (4), e0122415.
94. Zillikens MC1, v. M. (2009). SIRT1 genetic variation is related to BMI and risk of obesity. *Diabetes.* , 58 (12), 2828-34.

### **RINGRAZIAMENTI:**

Ringrazio la Dott.ssa Rossana Scuri per avermi dato la possibilità di collaborare nello sviluppo di un progetto stimolante e innovativo che ha alimentato la mia curiosità e il mio concetto di sfida; per il tempo dedicatomi durante la stesura di questa tesi; per la sua professionalità e la sua precisione che hanno reso migliore questo lavoro.

Ringrazio il Dott. Giuseppe Federighi per avermi accompagnato in tutti questi mesi, in ogni tappa del progetto, condividendo impegno, attese e lunghe chiacchierate.

Ringrazio tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione di questo progetto, fornendo il materiale e il proprio impegno: i tecnici del Dipartimento di Fisiologia, il collega Jonathan Fusi, il Dott. Ferdinando Franzoni e il Dott. Rodolfo Bernardi.